

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Petr Kala**

Úloha renální dysfunkce v patofyziologii progresu chronického srdečního selhání: preklinické studie na zvířecích modelech.

The role of renal dysfunction in pathophysiology of congestive heart failure progression: preclinical animal studies.

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Josef Veselka, CSc.

Konzultant: prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc., MBA

Praha, 2022

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11. 3. 2022

MUDr. Petr Kala

.....

Podpis autora

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Josefu Veselkovi, CSc. a konzultantovi prof. MUDr. Lud'ku Červenkovi, CSc., MBA, za odborné vedení, pomoc a cenné rady během celého studia.

Děkuji také kolegům z Oddělení kardio-renálního výzkumu Centra experimentální medicíny IKEM za pomoc a spolupráci.

V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a trpělivost v průběhu celého studia, zejména své ženě.

# **Úloha renální dysfunkce v patofyziologii progresu chronického srdečního selhání: preklinické studie na zvířecích modelech.**

## **Abstrakt**

Práce se zabývá úlohou a možnostmi farmakologického ovlivnění eikosanoidů, zejména kyselin epoxyeikosatrienových (EETs), epoxygenázových metabolitů kyseliny arachidonové (AA), u animálního modelu chronického srdečního selhání (CHSS) navozeného objemovým přetížením po vytvoření aorto-kavální píštěle (ACF) u hypertenzních transgenických potkanů (TGR). Potvrdili jsme sníženou tkáňovou koncentraci EETs v myokardu levé komory a v ledvině, pravděpodobně způsobenou zvýšenou degradací pomocí solubilní epoxid hydrolázy (sEH). Farmakoterapie perorálním analogem EETs (EET-A) zlepšila přežívání ACF TGR oproti neléčené skupině, ale bez statisticky významného zlepšení při kombinaci EET-A s inhibítorem angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACEi). Příznivý vliv terapie EET-A byl dán zlepšením srdečních parametrů a zmenšením plicní kongesce, nikoliv zmírněním renální dysfunkce. U ACF TGR samců (nikoli u samic) měla kombinace sEH inhibitoru (sEHi) s ACEi horší přežívání oproti monoterapii ACEi. Naše výsledky podporují další budoucí výzkum a možné využití farmakologického ovlivnění CYP-dependentního metabolismu AA, zejména analogů EETs, v terapii srdečního selhání a zdůrazňují význam testování nových farmakologických přístupů u obou pohlaví, včetně preklinických studií.

## **Klíčová slova**

chronické srdeční selhání, chronické renální selhání, cytochrom P450, EET-A, epoxyeikosatrienové kyseliny, renin-angiotenzin-aldosteronový systém, solubilní epoxid hydroláza, tlakově-objemová analýza

# **The role of renal dysfunction in pathophysiology of congestive heart failure progression: preclinical animal studies.**

## **Abstract**

The thesis describes effects and pharmacological targets of eicosanoids, especially epoxyeicosatrienoic acids (EETs) that are epoxygenase metabolites of arachidonic acid (AA), in animal model of congestive heart failure (CHF) induced by volume overload via aorto-caval fistula (ACF) in hypertensive transgenic rats (TGR). Our data show that ACF TGR exhibits tissue deficiency of EETs in the left ventricle and kidney, probably mainly caused by increased EETs degradation by soluble epoxide hydrolase (sEH). Treatment by orally active EETs analogue (EET-A) improved the survival rate in ACF TGR compared to placebo. However, after adding EET-A to angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi) treatment, the survival of ACF TGR only tended to improve compared with the effects of EET-A or ACEi given alone. The protective effects of EET-A treatment were mediated by improving cardiac parameters and reducing lung congestion, not dominantly by renal mechanisms. We also found that among male (not in female) the combination of sEH inhibitor (sEHi) and ACEi treatment worsened the mortality of ACF TGR compared to ACEi monotherapy. Our data support the notion that targeting the CYP-dependent epoxygenase pathway of AA should be considered in attempts to develop new pharmacological strategies for HF treatment and enhance the importance of testing the gender differences in pre- and clinical studies.

## **Keywords**

chronic kidney disease, congestive heart failure, cytochrome P450, EET-A, epoxyeicosatrienoic acid, pressure-volume analysis, renin-angiotensin-aldosterone system, soluble epoxide hydrolase

## Seznam zkratek

20-HETE	20-hydroxyeikosatetraenová kyselina
A	adrenalin
AA	kyselina arachidonová
ACE	angiotenzin-konvertující enzym
ACE2	angiotenzin-konvertující enzym typ 2
ACEi	inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu
ACF	aorto-kavální píštěl
ADH	antidiuretický hormon
AKS	akutní koronární syndrom
ANG 1-7	angiotenzin 1-7
ANG I	angiotenzin I
ANG II	angiotenzin II
ANP	natriuretický peptid typu A
ARB	blokátor AT <sub>1</sub> receptoru pro angiotenzin II
ARNi	kombinovaný AT <sub>1</sub> receptorový blokátor a inhibitor neprilysinu
AT <sub>1</sub>	receptor pro angiotenzin II typu 1
AT <sub>2</sub>	receptor pro angiotenzin II typu 2
BNP	natriuretický peptid typu B
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCD	korová část sběracího kanálku ledvin
CKD	chronické onemocnění ledvin
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol
DHETs	dihydroxyeikosatrienové kyseliny
DM	diabetes mellitus
EET-A	analog epoxyeikosatrienových kyselin
EETs	epoxyeikosatrienové kyseliny
EFLK	ejekční frakce levé komory
E <sub>m</sub>	membránové napětí
ENaC	epiteliální sodíkový kanál citlivý k amiloridu
ESKD	konečné stádium onemocnění ledvin
ET	endotelinový systém

ET <sub>A</sub>	endotelinový receptor typu A
ET <sub>B</sub>	endotelinový receptor typu B
GFR	glomerulární filtrace
HFmrEF	srdeční selhání s ejekční frakcí levé komory ve středním pásmu
HFpEF	srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí levé komory
HFrEF	srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí levé komory
CHSS	chronické srdeční selhání
ICHS	ischemická choroba srdeční
IP <sub>3</sub>	inositoltrifosfát
LK	levá komora
NA	noradrenalin
NEP	neprilysin
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NT-proBNP	N-terminální fragment prohormonu natriuretického peptidu typu B
NYHA	New York Heart Association
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub>
PKL	průtok krve ledvinou
PLA	fosfolipáza A
PLC	fosfolipáza C
PNS	parasymptický nervový systém
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronový systém
ROS	reaktivní formy kyslíku
sEH	solubilní epoxid hydroláza
SNS	sympatický nervový systém
TAC	transverzální konstrikce aorty
TALH	tlustý segment vzestupného raménka Henleovy kličky
TGR	hypertenzní Ren-2 transgenní potkan

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract.....	5
Seznam zkratek.....	6
1. Teoretický úvod.....	10
1.1. Chronické srdeční selhání.....	10
1.2. Preklinické animální modely CHSS .....	11
1.2.1. Model objemového přetížení.....	12
1.2.2. Další animální modely CHSS .....	12
1.3. Kardiovaskulární systém a ledviny.....	13
1.4. Patofyziologické aspekty chronického srdečního selhání .....	14
1.4.1. Hemodynamické změny.....	14
1.4.2. Deficit železa a anémie .....	15
1.4.3. Autonomní nervový systém .....	16
1.4.4. Renin-angiotenzin-aldosteronový systém .....	17
1.4.5. Natriuretické peptidy.....	21
1.4.6. Eikosanoidy.....	21
1.4.6.1. Epoxyeikosatrienové kyseliny .....	22
1.4.6.2. 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina.....	23
2. Hypotéza disertační práce.....	26
3. Cíle disertační práce .....	26
4. Metody a materiál .....	27
4.1. Pokusná zvířata .....	27
4.1.1. HanSD a TGR(Ren2)27 potkani .....	27
4.2. Chemikálie a metody .....	27
4.2.1. Stanovení hladin ANG II, EETs, DHETs, 20-HETE v plazmě, v ledvině a v levé komoře srdeční.....	28
4.2.2. Stanovení albuminu v moči.....	29
4.2.3. Stanovení proteinových expresí CYP4A, CYP2C23 epoxygenázy a sEH v kůře ledvin a v levé komoře srdeční .....	29
4.2.4. Aorto-kavální píštěl.....	29
4.2.5. Echokardiografie .....	30
4.2.6. Tlakově-objemová analýza levé komory srdeční.....	30
4.2.7. Měření průtoku krve ledvinou, glomerulární filtrace a natriurézy.....	31



4.2.5. Statistická analýza.....	32
5. Analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A).....	33
5.1. Série 1: Hodnocení aktivity RAAS, SNS a CYP metabolitů a enzymů v časných fázích srdečního selhání u ACF TGR.....	33
5.2. Série 2: Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na srdeční funkce u ACF TGR.....	38
5.3. Série 3: Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na renální hemodynamiku a na funkce ledvin u ACF TGR.....	43
5.4. Série 4: Vliv dlouhodobé monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na mortalitu, albumiurii a srdeční funkce u ACF TGR.....	45
5.5. Diskuze.....	51
5.5.1. Aktivita neurohumorálních systémů u srdečního selhání navozeného ACF.....	51
5.5.2. Vliv terapeutických režimů na přežívání.....	52
5.5.3. Mechanizmy příznivého terapeutického účinku.....	52
6. Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEHi).....	54
6.1. Vliv kombinované léčby sEHi s ACEi na přežívání a renální funkce u potkaního CHSS.....	54
6.1.1. Série 1: Vliv kombinované léčby ACEi a sEHi na přežívání ACF TGR potkanů.....	54
6.1.2. Série 2: Vliv dvoutýdenní kombinované léčby ACEi a sEHi na váhu orgánů, krevní tlak a na renální hemodynamiku a exkreční funkce u ACF TGR.....	55
6.1.3. Diskuze.....	59
6.2. Pohlavní rozdíly v mortalitě TGR po vytvoření ACF: efekt monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi a sEHi.....	60
6.2.1. Vliv monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi a sEHi na přežívání HanSD i TGR samic a samců po vytvoření ACF.....	61
6.2.2. Diskuze.....	65
7. Závěr.....	67
8. Summary.....	69
9. Literatura.....	70
10. Publikační činnost autora disertační práce.....	87

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Chronické srdeční selhání

Chronické srdeční selhání (CHSS) je jednou z nejvýznamnějších globálních příčin mortality a morbidit. Pro svou až pandemickou prevalenci se stalo závažným celosvětovým problémem, a to nejen zdravotnickým, ale i socioekonomickým. Odhady prevalence uvádí 2-3 % v rozvinutých zemích s roční incidencí až 300 na 100 tis. obyvatel (Conrad *et al.* 2018; McDonagh *et al.* 2021; Metra & Teerlink 2017; Ziaecian & Fonarow 2016). Za poslední desetiletí se prevalence onemocnění v rozvinutých zemích zvýšila o 23 % (Conrad *et al.* 2018), je odhadováno, že do roku 2030 se má dále zvýšit až o 46 % a ještě více zatížit zdravotnické systémy (Savarese & Lund 2017). Jedním z významných faktorů tohoto nárůstu je stárnutí populace a prodlužování průměrné délky života, jelikož prevalence CHSS roste s věkem. Polovina nemocných s CHSS je starších 75 let, u lidí starších 80 let je jeho prevalence kolem 10 % (Dunlay *et al.* 2017; Ziaecian & Fonarow 2016).

V posledních desetiletích se zlepšila dostupnost a kvalita péče o pacienty s akutními koronárními syndromy (AKS), je kladen důraz na rychlost ošetření ischemického myokardu a kompletnost revaskularizace, a tím na zmenšení dopadu na jeho funkčnost. Na akutní následky zemře méně pacientů, ale o to více roste podíl pacientů s rozvojem CHSS (McDonagh *et al.* 2021; Metra & Teerlink 2017; Roger 2013). Ischemická choroba srdeční (ICHS) je nejčastější příčinou rozvoje CHSS, až u 50 % pacientů (Lala & Desai 2014). Mezi další významné rizikové faktory patří arteriální hypertenze, diabetes mellitus (DM), spolu s obezitou a komplexním metabolickým syndromem, a socioekonomické aspekty (Conrad *et al.* 2018; Roger 2013). Odhaduje se, že u každého devátého muže a šesté ženy bez ICHS se rozvine CHSS (Lloyd-Jones *et al.* 2002). Na růstu celosvětové prevalence CHSS se může podílet i znečištění ovzduší (Shah *et al.* 2013).

Srdeční selhání je syndrom charakterizovaný subjektivními symptomy (dušnost, otoky, únava, nechutenství) a objektivními známkami (zvýšená náplň krčních žil, poslechový nález na plicích, periferní otoky, ascites), je způsobený strukturálními nebo funkčními abnormalitami srdce, které vedou ke zvýšení intrakardiálních tlaků nebo snížení srdečního výdeje v klidu nebo při zátěži (Boron; Boulpaep 2016; Metra & Teerlink 2017; Ponikowski *et al.* 2016). Srdeční selhání je neschopnost srdce zajistit dodávky krve pro aktuální potřeby organismu, nebo pouze za cenu zvýšení plicních tlaků, což reflektuje

aktuální klasifikace CHSS na srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí levé komory (HFrEF, ejekční frakce levé komory EFLK <40 %) a srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí levé komory (HFpEF, EFLK >50 %), kde dominuje porucha diastolické funkce levé komory (LK). EFLK mezi 40 a 50 % je označována jako srdeční selhání s ejekční frakcí LK ve středním pásmu (HFmrEF) (McDonagh *et al.* 2021; Pfeffer *et al.* 2019; Ponikowski *et al.* 2016). Zastoupení HFpEF v populaci pacientů s CHSS se odhaduje na 50 %, jedná se typicky o starší pacienty, průměrně o 6 let při primomanifestaci HFpEF než HFrEF, častěji ženy - o 30-40 % více než u HFrEF, s více komorbiditami (arteriální hypertenze, DM, obezita, fibrilace síní, renální dysfunkce) (Pfeffer *et al.* 2019).

U mužů je častější ischemická dysfunkce LK s rozvojem HFrEF, kdežto u žen spíše HFpEF. Zároveň jsou ženy při primomanifestaci CHSS starší a s více komorbiditami (Lam *et al.* 2019; Savarese & D'Amario 2018). Ve švédském registru se 43 000 pacientů s CHSS mělo 29 % žen HFrEF, oproti 55 % s HFpEF a 39 % s HFmrEF (Stolfo *et al.* 2019). S ohledem na četnost hospitalizací a přežití mají celkově ženy srovnatelnou prognózu s muži, bez ohledu na EFLK (Lam *et al.* 2019; Savarese & D'Amario 2018).

Klinický průběh onemocnění je ve většině případů progresivní, ale nelineární, charakterizovaný epizodami akutních dekompenzací, i navzdory narůstající péči (Allen *et al.* 2012; Chaudhry & Stewart 2016). Prognóza pacientů s CHSS není příznivá, uvádí se roční mortalita od 6-7 % u stabilních pacientů s CHSS, přes 25 % u akutního nebo akutně dekompenzovaného CHSS, po 75 % u pokročilého či terminálního CHSS (Chaudhry & Stewart 2016; Metra & Teerlink 2017; Ric R Ose *et al.* 2001). Celkově je 5letá mortalita od diagnostikování CHSS kolem 50 %, což je horší než u většiny nádorových onemocnění (Riehle & Bauersachs 2019). **Proto je urgentně potřeba vyvíjet nové farmakologické a nefarmakologické intervence vedoucí k udržení stabilní fáze CHSS a zlepšení prognózy pokročilého CHSS, k čemuž je zásadním předpokladem detailní znalost patofyziologie, kterou lze studovat na animálních modelech.**

## 1.2. Preklinické animální modely CHSS

Patofyziologie CHSS se zkoumá od molekulární podstaty, přes celulární a orgánové změny, až po komplexní projevy na mnoha animálních modelech. Cílem preklinického výzkumu je detailní pochopení příčin rozvoje CHSS, procesů vedoucích k dekompenzaci, interakcí mezi dalšími orgány, s následnou identifikací možných terapeutických intervencí ke zvrácení nepříznivé prognózy pacientů s CHSS. K tomuto účelu jsou potřeba animální modely, které co nejvěrohodněji simulují humánní CHSS (Carlson 2012; Cops *et al.* 2019).

CHSS je komplexní onemocnění s individuální etiologií a patofyziologií u konkrétního pacienta, avšak některé aspekty jsou společné pro větší skupiny pacientů, jako např. retence tekutin, plicní kongesce, neurohumorální aktivace, subcelulární změny a další. Snahou je tyto charakteristiky navodit u animálních modelů. Vzniklé modely však mají své limity a žádný není dokonalý. Definované genetické pozadí každého zvířecího druhu se liší *a priori* od lidského genomu. CHSS je ve většině případů multifaktoriální onemocnění, a proto jedním patofyziologickým zásahem nemusíme dosáhnout potřebné komplexnosti problému, což může omezovat, či zkreslovat klinický dopad získaných výsledků (Carlson 2012; Riehle & Bauersachs 2019). Možností, jak tomu předejít, jsou kombinované patofyziologické zásahy (např. navození CHSS a chronické renální insuficience nebo CHSS u geneticky podmíněného hypertenzního modelu a další), ovšem poté je potřeba velmi obezřetná interpretace (Riehle & Bauersachs 2019). Je známo několik animálních modelů CHSS, které můžeme dělit podle různých parametrů – druh zvířete, způsob indukce CHSS atd. Níže stručně zmíním modely, které se vztahují k experimentální části naší práce.

### **1.2.1. Model objemového přetížení**

Model objemového přetížení srdce navozeného chirurgickým vytvořením zkratu mezi abdominální aortou a dolní dutou žílou, tzv. aorto-kavální píštěl (ACF), je relativně jednoduchým a dobře reprodukovatelným preklinickým modelem imitujícím určité klíčové aspekty CHSS (Flaim *et al.* 1979; Garcia & Diebold 1990; Hilton *et al.* 1955). Po vytvoření ACF dochází postupně k objemovému přetížení srdce se zvýšením srdečního výdeje, nárůstu napětí stěny (“wall-stressu“), excentrické hypertrofii obou srdečních komor a aktivaci neurohumorálních systémů – jako jsou vazokonstrikční/natriumretenční systémy a kompenzační vazodilatační/natriuretické systémy (Abassi *et al.* 2011). Po určité fázi kompenzace a stabilní fázi onemocnění progreduje do rozvoje klinických příznaků, jako piloerekce, letargie, ascites, cyanóza a dušnost, kdy již výrazně narůstá mortalita (Melenovsky *et al.* 2011, 2012). Tento model je možné využít u celého animálního spektra, zprvu byl použit u psů (Hilton *et al.* 1955), dále pak s rozvojem mikrochirurgických technik u potkanů (Garcia & Diebold 1990) a myši (Karram *et al.* 2005).

### **1.2.2. Další animální modely CHSS**

Ischemický model založený na trvalé, nebo přechodné okluzi/podvazu levé koronární tepny s eventuální následnou reperfuzí představuje model simulující poinfarktovou etiologii CHSS. Na tomto modelu byl prokázán vztah mezi velikostí infarktem zasaženého

myokardu, poinfarktové remodelace, dilatace LK a její dysfunkcí (Pfeffer *et al.* 1979). Následně začalo úspěšné tažení inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACEi) u CHSS (Pfeffer *et al.* 1985a, 1985b). Jedná se o časově i technicky náročnější model s relativně vysokou perioperační mortalitou a variabilitou ve velikosti postiženého myokardu, a tím i v závažnosti dysfunkce LK.

Model tlakového přetížení navozený transverzální konstrikcí aorty (TAC) na úrovni ascendentní nebo descendentní aorty imituje postižení srdce při dlouhodobě neléčené hypertenzi nebo aortální stenóze, které ve svém důsledku také vedou k CHSS (Rockman *et al.* 1994). TAC zvyšuje afterload LK s rozvojem koncentrické hypertrofie a následně CHSS. Limitací modelu je okamžitý nárůst afterloadu po navození TAC, oproti dlouhodobému působení neléčené hypertenze nebo aortální stenózy.

Mezi modely CHSS založené na kardiotoxicitě patří doxorubicinem-indukované CHSS. Doxorubicin je antracyklinové chemoterapeutikum, inhibitor topoizomerázy typu II, využívané v onkologii, zejména u hematopoetických malignit, či karcinomu prsu nebo plic. Pro jeho známou pozdní kardiotoxicitu je snaha o snížení užívání, ale v některých schématech pro konkrétní nádorové subtypy má stále své místo (Bristow *et al.* 1980; McGuire *et al.* 2018; Rivankar 2014). Po intraperitoneální či intravenózní aplikaci kumulativní dávky doxorubicinu dochází u potkanů k rozvoji CHSS s fenotypem dilatační kardiomyopatie s myokardiální atrofií, dilatací a dysfunkcí obou komor (Hayward & Hydock 2007). Chronická  $\beta$ -adrenergní stimulace pomocí isoproterenolu navozuje myokardiální hypertrofii a fibrózu s rozvojem CHSS, které imituje tachykardií-indukovanou systolickou dysfunkci LK, na podkladě například fibrilace síní s rychlou odpovědí komor (Teerlink *et al.* 1994).

Zavedení věrohodného HFpEF modelu je limitováno heterogenitou tohoto onemocnění a širokým spektrem komorbidit spolupodílejících se na jeho etiopatogenezi (fibrilace síní, hypertenze, obezita, stárnutí, DM, renální dysfunkce, chronická obstruktivní plicní nemoc), a proto v tuto chvíli neexistuje všeobecně uznávaný animální model (Riehle & Bauersachs 2019).

### **1.3. Kardiovaskulární systém a ledviny**

Pacienti s CHSS mají často více komorbidit, včetně renální dysfunkce, uvádí se, že prevalence chronického onemocnění ledvin (CKD) s glomerulární filtrací (GFR) pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> u pacientů s CHSS je 40-50 % (McAlister *et al.* 2004; Van Deursen *et al.* 2014; Zannad *et al.* 2021). Naopak pouze okolo 17 % pacientů s CHSS má normální

filtrační frakci s GFR nad 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (McAlister *et al.* 2004). GFR je nezávislým prognostickým prediktorem pro rozvoj i progresi kardiovaskulárních onemocnění, včetně CHSS (Hillege *et al.* 2006; McAlister *et al.* 2004). Více než 60 % pacientů s CKD mají nějakou formu kardiovaskulárního onemocnění a závažnost CKD silně koreluje s prognózou. U pacientů s GFR pod 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> je riziko rozvoje CHSS 3krát větší než u zdravé populace (Kottgen *et al.* 2007). Nejvýznamněji je tento vztah vyjádřen u pacientů s konečným stádiem onemocnění ledvin (ESKD) na dialyzační terapii, kteří mají 10-30krát vyšší celkovou kardiovaskulární mortalitu oproti běžné populaci, tedy 30letý pacient s ESKD v dialyzačním programu má stejnou pravděpodobnost smrti z příčiny kardiovaskulární jako 80letý muž v běžné populaci (Go *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2007).

## **1.4. Patofyziologické aspekty chronického srdečního selhání**

### **1.4.1. Hemodynamické změny**

Dle definice srdečního selhání může docházet ke dvěma hemodynamickým problémům: ke snížení srdečního výdeje, resp. k jeho nedostatku vzhledem k potřebám organismu, nebo k nárůstu plicních tlaků pro udržení srdečního výdeje, což se přenáší před srdce ve formě venostázy a plicní kongesce.

Při akutní hemodynamické alteraci tělo aktivuje obranné mechanismy. Na udržení systémového arteriálního tlaku, který je dán srdečním výdejem a periferní cévní rezistencí, se podílí zejména vazokonstrikční a natriumretenční systémy (sympatický nervový systém - SNS, renin-angiotenzin-aldosteronový systém - RAAS, antidiuretický hormon - ADH, endotelinový systém - ET) zvyšující periferní rezistenci, cirkulující objem a působící pozitivně chronotropně, inotropně, dromotropně i batmotropně (Ponikowski *et al.* 2016; Schefold *et al.* 2016). Z krátkodobého hlediska jsou tato opatření nezbytná k udržení dostatečné perfuze životně důležitých orgánů, avšak při dlouhodobé aktivaci dochází k hypoperfuzi periferních tkání a jejich dysfunkci (Boron; Boulpaep 2016; Packer 1992; Raina *et al.* 2020; Reddy *et al.* 2020).

Ledviny jsou k udržení své hlavní exkreční funkce vybaveny, oproti jiným orgánům, speciálními autoregulačními mechanismy (tubuloglomerulární zpětná vazba a myogenní mechanismus), které regulují průtok krve ledvinou (PKL), a tím udržují stabilní glomerulární filtraci v rozmezí 80 až 180 mmHg středního arteriálního tlaku (Carlström *et al.* 2015). Při poklesu středního arteriálního tlaku se aktivuje tubuloglomerulární zpětná vazba a RAAS, což regulací intrarenální cirkulace vede k udržení filtračního tlaku, a tím glomerulární filtrace, avšak na úkor poklesu PKL. Při dalším snižování arteriálního tlaku a

poklesu PKL se při vyčerpání autoregulační kapacity ledvin začíná paralelně snižovat i glomerulární filtrace (Damman & Testani 2015; Ljungman *et al.* 1990). Tím dochází k hromadění zplodin metabolismu, zejména dusíku (kreatinin, urea a další), jejichž exkrece je závislá na glomerulární filtraci, a to může vést až k rozvoji uremického syndromu. Při oligurii, či anurii dominuje retence vody a solí, což vede k další progresi CHSS (Schefold *et al.* 2016).

Venostáza je druhým významným hemodynamickým aspektem přispívajícím k deterioraci nejen renálních funkcí. Při snížené poddajnosti levé a pravé komory jsou potřeba vyšší plicní tlaky k jejich dostatečnému naplnění a zachování srdečního výdeje skrze udržení systolického objemu, což se může zprvu projevit jen při zátěži. Ke snížení poddajnosti dochází bez ohledu na velikost ejekční frakce levé komory a důsledky zvýšených plicních tlaků jsou hlavním patofyziologickým aspektem HFpEF (Obokata *et al.* 2018; Pfeffer *et al.* 2019). Zvýšení plicních tlaků komor se přenáší do plicní cirkulace ve formě plicní kongesce, která se klinicky projevuje námahovou dušností, postupně i klidovou až plicním edémem (Melenovsky *et al.* 2015; Reddy *et al.* 2019). K venostáze dochází i funkčně před pravou komorou, s rozvojem kongesce v játrech, žilní drenáži střev, ledvinách a dolních končetinách, což se klinicky může manifestovat jako nechutenství, poruchy jaterních funkcí (vč. sekundárního hyperaldosteronizmu), snížená funkce střev, snížená funkce ledvin, otoky dolních končetin, zvýšená náplň krčních žil, ascites nebo až anasarka (Renkin 1986; Roumelioti *et al.* 2018).

Při ledvinné kongesci dochází ke zvýšení intraluminálního tlaku, a tím ke snížení transglomerulárního filtračního tlaku, a tudíž až ke snížení GFR. Dalšími aspekty jsou lokální hypoxie, endoteliální dysfunkce, zvýšený oxidativní stres, proinflamatorní odpověď a aktivace RAAS (Afsar *et al.* 2016). Zvýšení centrálního venózního tlaku koreluje se snížením GFR a horší prognózou pacientů s CHSS a jinými kardiovaskulárními onemocněními (Damman *et al.* 2007; Damman & Testani 2015; Takahama & Kitakaze 2017).

#### **1.4.2. Deficit železa a anémie**

Deficit železa (hladina ferritinu pod 100 ug/l nebo mezi 100-199 ug/l při saturaci transferinu pod 20 %) až anémie (hladina hemoglobinu pod 120 g/l u žen a 130 g/l u mužů) jsou velice častými komorbiditami u pacientů s CHSS (až u 50 % pacientů) a jsou nezávislými rizikovými faktory špatné prognózy. Pacienti s CHSS a anémií mají o 30 % zvýšené riziko hospitalizací pro srdeční selhání a o 100 % vyšší relativní riziko úmrtí oproti neanemickým pacientům (Komajda *et al.* 2006; Mentz *et al.* 2014). Anémie se u

pacientů s CHSS podílí i na intoleranci zátěže a zhoršené kvalitě života (Tim Goodnough *et al.* 2017). Pacienti s CHSS bez anémie mají riziko rozvoje anémie do 1 roku 14 % a do 5 let 25 % (Komajda *et al.* 2006).

Etiologie anémie u CHSS je multifaktoriální, podílí se na ní hemodiluce při kongesci, prozánětlivý stav organismu, včetně zvýšené produkce hepcidinu, který inhibuje vstřebávání železa ze zažívacího traktu a snižuje jeho dostupnost pro hematopoézu, zároveň je vlivem kongesce ve splachnickém řečišti redukována absorpční schopnost střev (Lopez *et al.* 2016; Petrak *et al.* 2019; Weiss *et al.* 2019).

Randomizované studie prokázaly efekt intravenózní suplementace železa na zlepšení zátěžové kapacity, kvality života i redukcí hospitalizací z důvodu CHSS (Anker *et al.* 2009; Okonko *et al.* 2008; Ponikowski *et al.* 2015, 2020). Při substituci dochází jednak k částečné korekci anémie, ale i ke zlepšení funkce mitochondriálních enzymů a svalů závislých na dodávce železa (Melenovsky *et al.* 2017). Naopak perorální substituce železa nevedla ke zlepšení zátěžové kapacity, pravděpodobně vlivem sníženého vstřebávání takto podávaného železa (Lewis *et al.* 2017).

Nejčastější komorbiditou, která přispívá k rozvoji deplece železa a anémii u CHSS, je CKD. Prevalence anémie u CKD roste s klesající GFR (Tim Goodnough *et al.* 2017). CKD se na anémii podílí chronickým prozánětlivým stavem, retencí tekutin s hemodilucí, urémií indikovanou inhibicí erytropoézy a sníženou produkcí erytropoetinu (Webster *et al.* 2017). Erytropoetin je glykoproteinový hormon produkovaný intersticiálními fibroblasty ledvin, který stimuluje erytropoézu v kostní dřeni a řídí homeostázu železa. Pacienti s CKD a anémií mají sníženou kvalitu života, zvýšené riziko kardiovaskulárních příhod, vyšší pravděpodobnost hospitalizace, kognitivního deficitu a vyšší mortalitu (Lefebvre *et al.* 2006; Locatelli *et al.* 2004). Proto se při terapii anémie u CKD užívají rekombinantní erytropoetin, nebo erytropoetin-stimulující látky, a suplementace železa, nejúčinněji parenterální formou (Webster *et al.* 2017).

### **1.4.3. Autonomní nervový systém**

CHSS je spojeno s dysregulací autonomního nervového systému, útlumem parasymptatiku (PNS) a aktivací sympatiku (SNS), což evolučně z krátkodobého hlediska pomáhá vypořádat se s akutním stavem, ale při chronickém působení se podílí na patofyziologii progresu CHSS (Amorim *et al.* 1981; Floras 2009; Floras & Ponikowski 2015).

SNS je ovlivňován kardiovaskulárním systémem na úrovni reflexních mechanismů několika typů receptorů: kardiopulmonálních receptorů (vč. Bezold-Jarischova reflexu) a



baroreceptorů karotických tepen a oblouku aorty, které inhibují SNS, a naopak kardiovaskulárních nízkoprahových polynodálních receptorů a periferních chemoreceptorů, které aktivují SNS (Floras & Ponikowski 2015). Tyto reflexy jsou dysregulovány u CHSS, což vede k hyperaktivaci SNS. Při CHSS dochází také k humorální aktivaci SNS volně cirkulujícím a mozkovým angiotenzinem II (ANG II), naopak natriuretické peptidy SNS tlumí (Watson *et al.* 2006; Zhang & Anderson 2014).

SNS působí přímo přes noradrenalin (NA) sekretující neurony, po stimulaci nadledvin dochází navíc k vyplavení adrenalinu (A) a NA do cirkulace, kde účinkují v závislosti na typu přítomného receptoru. Sympatické ganglion stellatum stimuluje sinoatriální (SA) uzel, atrioventrikulární (AV) uzel a myokard komor, čímž dochází ke zrychlení srdeční frekvence, rychlejšímu převodu vzruchu v srdci a zvýšení kontraktility myokardu. V periferní cirkulaci dochází při převaze sympatické aktivace k arteriální vazokonstrikci (zvýšení systémové vaskulární rezistence, centralizace oběhu) a k venokonstrikci (snížení kapacitance cév a zvýšení preloadu) (Floras & Ponikowski 2015; Florea & Cohn 2014).

V ledvině vede zvýšená aktivita SNS při CHSS k vazokonstrikci zejména aferentní arterioly (Luff *et al.* 1992) s následným snížením PKL a eventuálně i GFR. Aktivita SNS je také důležitým modulátorem tubuloglomerulární zpětné vazby (Burnstock & Loesch 2017), kdy juxtaglomerulární buňky reagují na sympatickou stimulaci vyplavením reninu do cirkulace, čímž se aktivuje RAAS. Zároveň při SNS stimulaci dochází ke zvýšenému vstřebávání sodíku a vody epitelem proximálního a distálního tubulu i sběracích kanálků (Burnstock & Loesch 2017; Ramchandra & Barrett 2015). Snížený PKL nebo zvýšený tlak v renální žíle při CHSS ovlivňují aktivitu renálních chemo- a mechanoreceptorů, které prostřednictvím renálních aferentních sympatických nervů vedou k dalšímu vystupňování výše zmíněného dopadu SNS na renální funkce (Booth *et al.* 2015). Zvýšená aktivita renálního SNS, měřená pomocí průtoku noradrenalinu ledvinou, nezávisle koreluje se zvýšenou mortalitou pacientů s CHSS, a to nezávisle na celkové SNS aktivitě, GFR nebo ejekční frakci levé komory (Rundqvist *et al.* 2005). Koncept renální sympatické denervace u CHSS je aktuálně intenzivně zkoumán preklinickými i klinickými studiemi (Honetschlagerová *et al.* 2021; van Bilsen *et al.* 2017).

#### **1.4.4. Renin-angiotenzin-aldosteronový systém**

Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS) je jedním ze základních neurohumorálních mechanismů, který se regulací krevního tlaku, složením elektrolytů a

objemu extracelulární tekutiny podílí na udržování vnitřního prostředí organismu. Jeho nadměrná aktivace je významným faktorem progresu CHSS (Hall 2003; Lee *et al.* 2001).

Játra konsekutivně secernují do cirkulace peptid angiotenzinogen. Ten je štěpen reninem, cirkulující proteázou produkovanou juxtaglomerulárními buňkami v aferentní arteriole ledviny, na angiotenzin I (ANG I). Angiotenzin-konvertující enzym (ACE) pak dále štěpí ANG I na angiotenzin II (ANG II), hlavní produkt klasické RAAS kaskády, který mimo jiné také stimuluje produkci aldosteronu v kůře nadledvin (obr. 1) (Riegger & Liebaw 1982).

Hlavním faktorem aktivity této osy RAAS je komplexní regulace vyplavování reninu z juxtaglomerulárních buněk aferentních arteriol ledvin. Snížená koncentrace sodíku a chloridů v distálním tubulu ledvin zvyšuje sekreci reninu, což je součástí mechanismu tubuloglomerulární zpětné vazby, která se zároveň podílí na autoregulaci PKL. Snížení perfuzního tlaku v aferentní arteriole stimuluje renin sekretující buňky, které tak fungují jako baroreceptory. Zvýšení tlaku v renální vředě má za následek vyšší vyplavování reninu do cirkulace a aktivaci intrarenálního RAAS (Kishimoto *et al.* 1973; Kopp *et al.* 1984). Zvýšená aktivita renálního SNS také zesiluje vyplavování reninu přes stimulaci  $\beta$ -adrenergických receptorů přítomných na buňkách juxtaglomerulárního aparátu (Persson 2003). ANG II, jako produkt klasické RAAS dráhy, pak inhibuje sekreci reninu negativní zpětnou vazbou.

Vedle klasické cesty ANG I – ACE – ANG II, dochází k tvorbě ANG II pomocí jiných peptidáz či proteáz, jako jsou chymáza, chymotrypsin nebo katepsin G (Hall 2003). Tato skutečnost vysvětluje tzv. „ACE escape“ fenomén, neboli neúčinnost inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACEi) u některých pacientů s CHSS (obr. 1) (Lee *et al.* 2001; Zablocki & Sadoshima 2010).

ANG II se primárně váže na receptory typu I ( $AT_1$ ), prostřednictvím kterých způsobuje vazokonstrikci odporových cév, stimuluje produkci aldosteronu v kůře nadledvin, produkci katecholaminů z dřene nadledvin a ze zakončení sympatických nervů, v centrálním nervovém systému (CNS) navozuje pocit žízně a stimuluje produkci vazopresinu (antidiuretického hormonu – ADH) z neurohypofýzy. Na srdce působí ANG II pozitivně inotropně a chronotropně, dále zvyšuje reabsorpci sodíku v ledvinných tubulech a ve střevě (Ma *et al.* 2010). ANG II zprostředkovaně působí jako prozánětlivý cytokin, růstový faktor a spolu s aldosteronem navozuje fibrózu cílových tkání, zejména srdce a ledvin (Rüster & Wolf 2011).

Mimo  $AT_1$  receptory, které jsou přítomny téměř ve všech tkáních v těle, se ANG II váže i na receptory typu 2 ( $AT_2$ ) vyskytující se převážně ve fetálních tkáních, krátce po

narození jejich exprese klesá (Li *et al.* 2012). AT<sub>2</sub> jsou v dospělosti lokalizovány v srdci, ledvinách, nadledvinách, mozku, vaječnicích a děloze, po navázání ANG II působí vazodilatačně, natriureticky, protizánětlivě, antifibroticky a zlepšují endoteliální funkci, tedy do určité míry antagonizují účinky ANG II přes AT<sub>1</sub> receptory (Matavelli & Siragy 2015), byť klinická relevance při patofyziologických stavech (např. arteriální hypertenze, CHSS) zůstává nejasná (Lemarié & Schiffrin 2009).

Alternativní dráha RAAS metabolizuje ANG II na angiotenzin 1-7 (ANG 1-7), který působí vazodilatačně, protizánětlivě, diureticky, natriureticky, organoprotektivně, a tím částečně antagonizuje dlouhodobé negativní působení ANG II (Santos *et al.* 2018). ANG 1-7 vzniká přímou přeměnou z ANG II pomocí angiotenzin-konvertujícího enzymu 2 (ACE2), dále může ANG 1-7 vznikat z ANG I přes meziprodukt angiotenzin 1-9 (ANG 1-9) působením ACE a ACE2. Proteáza neprilysin (NEP) může enzymaticky štěpit ANG I přímo na ANG 1-7 nebo přes meziprodukt ANG 1-9 (Domenig *et al.* 2016; Zhuo *et al.* 2013). Účinky ANG 1-7 jsou zprostředkovány vazbou na jeho specifický membránový s G proteinem-spřažený receptor Mas, který dále vede signál intracelulárně a aktivuje různé kaskády (např. syntézu NO, produkci cAMP, tvorbu kyslíkových radikálů) (obr. 1) (Gaidarov *et al.* 2018; Nicklin 2016; Santos *et al.* 2018).

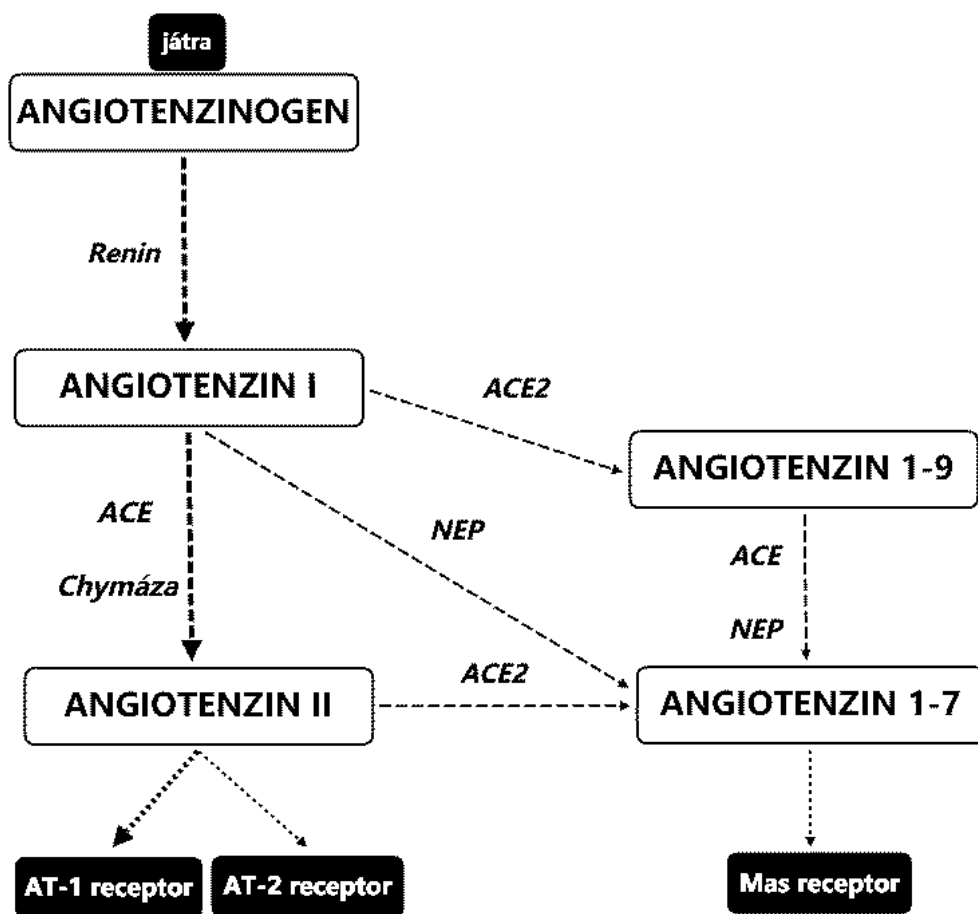
K aktivaci RAAS dochází při CHSS více cestami a zpětnovazebnými mechanismy. Jak již bylo popsáno výše, dysregulace vegetativního nervového systému s výraznou převahou SNS stimuluje přes renální nervy přímo renin-secernující buňky. Aktivace renálního SNS vede také ke snížení PKL, což bez zapojení kompenzačních mechanismů vyvolá pokles GFR. Dostává se menší množství primární moče, a tedy i sodíkových a chloridových iontů do distálního tubulu, navíc při zvýrazněné zpětnovazebné resorpci vody a iontů. To aktivuje buňky macula densa, které stimuluji RAAS, jehož hlavní efektor ANG II působí vazokonstrikčně preferenčně na eferentní arteriolu v glomerulu, čímž dochází ke zvýšení GFR, a tudíž se zvyšuje i množství vody a sodíku přefiltrované do tubulu. Tato zpětná vazba je jedním ze základních regulačních opatření nefronu proti přílišným výkyvům GFR (Sparks *et al.* 2014). Dalšími stimuly k aktivaci RAAS jsou mechanoreceptory v renální žíle reagující na kongesci s venostázou při CHSS a buňky macula densa vyplavující renin při snížení systémového arteriálního tlaku, často doprovázející pokročilé formy CHSS (Kopp *et al.* 1984).

ANG II, navozuje přes AT<sub>1</sub> receptor vazokonstrikci odporových cév, zejména eferentních arteriol (Myers *et al.* 1975). Díky tomuto zpětnovazebnému mechanismu dochází k udržení GFR, ale za cenu snížení PKL. Dalším místem působení ANG II přes

AT<sub>1</sub> receptory jsou proximální tubulus, tlustá část vzestupného raménka Henleovy kličky a sběrací kanálky, kde ovlivňuje sodíko-vodíkový výměník, sodíko-fosfátový kotransport a další (Paxton *et al.* 1993; Sparks *et al.* 2014).

ANG II zároveň stimuluje produkci aldosteronu v kůře nadledvin. Aldosteron je dalším významným efektoem RAAS, který svým působením na amilorid-senzitivní sodíkový kanál (ENaC) zvyšuje resorpci sodíku z tubulů, čímž se podílí na zadržování sodíku a vody ledvinou. Aldosteron je metabolizován převážně v játrech. Při CHSS s významnou venostázou může docházet ke snížení jaterních funkcí a mimo jiné k sekundárnímu hyperaldosteronizmu. Aldosteron je navíc významným mediátorem fibrotických a prozánětlivých procesů v ledvině a srdci (Briet & Schiffrin 2010). Zánětlivá reakce, patologická přestavba ledvin a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) jsou při dlouhodobé aktivaci RAAS také zprostředkovány ANG II přes AT<sub>1</sub> receptory a podílí se na progresi renální dysfunkce (Sachse & Wolf 2007).

Dalším mechanismem koncentrace moče a zadržování vody v organismu je ANG II-zprostředkovaný antidiuretický účinek vazopresinu (antidiuretický hormon, ADH) ve dřeni ledvin (Sparks *et al.* 2014).



Obr. 1 Renin-angiotenzinový systém

### 1.4.5. Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy jsou látky s hormonálními účinky zastoupené zejména dvěma typy – natriuretický peptid typu A (ANP) a natriuretický peptid typu B (BNP), vznikající v síních, respektive v komorách srdečních. Stimulem pro tvorbu a vyplavování aktivních forem ANP a BNP je zvýšené napětí stěny myokardu nebo aktivace ET, ANG II a vazopresinových receptorů (Lee & Daniels 2016). Při CHSS dochází vlivem selhávání LK (jak u HFpEF, tak HFrEF) k nárůstu plicních tlaků LK a protektivně na to ke zvýšené tvorbě a vyplavování ANP a BNP, čehož se využívá v diagnostice CHSS, stanovuje se BNP a jeho N-terminální fragment (NT-proBNP) (Ibrahim & Januzzi 2017). ANP a BNP jsou degradovány proteázou neprilysinem nebo intracelulárně lysozomálně.

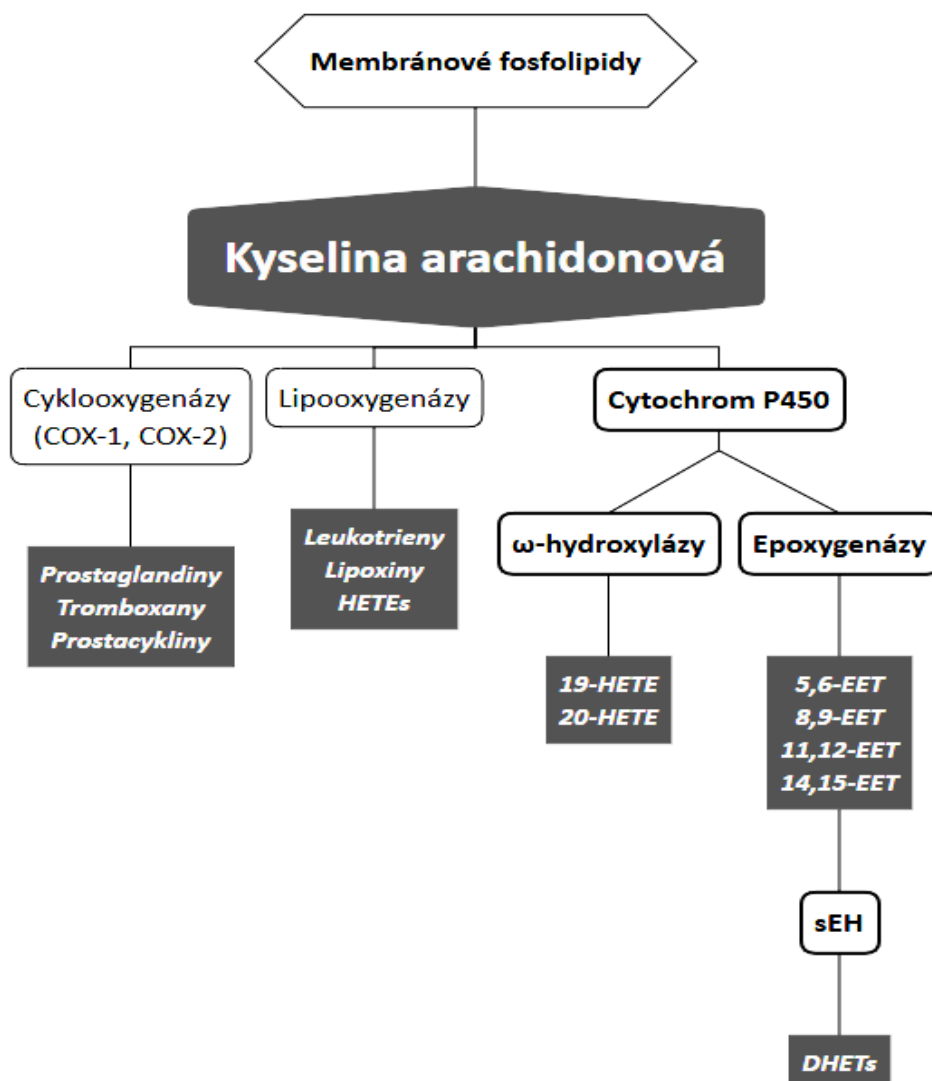
Natriuretické peptidy působí zejména v ledvinách, diuretický a natriuretický, tlumí aktivitu ENaC kanálu a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy ve sběracím kanálku, čímž dochází ke snížení zpětné resorpce sodíku, a tím i vody ledvinou. Zároveň blokují receptory pro vazopresin ve sběracím kanálku, inhibují produkci reninu juxtaglomerulárními buňkami nefronu, navozují vazodilataci aferentních arteriol a vedou ke zvýšení GFR. Systémově mají natriuretické peptidy antihypertenzní účinky, navozují hypovolémii a tlumí aktivitu SNS, kardiálně působí proti fibrotizaci a hypertrofii myokardu (Wong *et al.* 2017).

Vzhledem ke svým výše zmíněným účinkům působí natriuretické peptidy celkově protektivně oproti negativnímu působení dlouhodobě aktivovaného RAAS, SNS a dalších systémů při CHSS (Volpe *et al.* 2016). Zejména v pozdních fázích CHSS však tento kompenzační systém selhává, jednak pro vyčerpání schopnosti tvořit natriuretické peptidy v adekvátním množství k vyvážení SNS, RAAS a dalších systémů, a zároveň i pro rezistenci ledvin umocněnou jejich dysfunkcí při CKD (Chen 2007).

### 1.4.6. Eikosanoidy

Kyselina arachidonová (AA), významná složka buněčných membránových fosfolipidů, je metabolizována 3 hlavními cestami – cyklooxygenázovou drahou na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany; lipoxygenázovou drahou na lipoxiny, leukotrieny a hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETEs) a enzymy z rodiny cytochromu P450 -  $\omega$ -hydroxylázami na hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETEs) a epoxygenázami na epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs) (obr. 2). Vzniklé produkty jsou dále upravovány  $\beta$ -oxidací, esterifikací a dalšími reakcemi a dávají tím vzniknout vícero aktivním metabolitům s rozmanitými funkcemi v organismu; hrají důležitou úlohu v regulaci krevního tlaku, při zánětlivých procesech, v regulaci vylučování sodíku i ledvinných,

plicních a srdečních funkcí (Fleming & Busse 2006; Imig 2019; Imig *et al.* 2022; Roman 2002; Zhang *et al.* 2018).



Obr. 2 Metabolity kyseliny arachidonové

#### 1.4.6.1. Epoxyeikosatrienové kyseliny

EETs jsou parakrinní látky s významnými vazodilatačními a natriuretickými vlastnostmi. Rozlišujeme 4 základní izomery, podle umístění epoxidové skupiny, které vznikají z AA účinkem epoxygenáz třídy CYP2C a CYP2J: 5,6-EETs, 8,9-EETs, 11,12-EETs a 14,15-EETs. Jejich zastoupení se liší druhově i orgánově, a rovněž se mění v průběhu stárnutí (Imig 2019; Roman 2002). EETs jsou produkovány buňkami endotelu a působí zejména autokrinně a parakrinně na hladkou svalovinu cév. Limitací jejich biologického účinku je rychlé odbourávání solubilní epoxidovou hydrolázou (sEH) na biologicky neúčinné dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs) (Nayem *et al.* 2010; Sudhahar *et al.* 2010).

## Účinky – Regulace cévního tonu

EETs jsou syntetizovány v endotelových buňkách, působením bradykininu, acetylcholinu a smykového tření ve stěně cévy (shear-stress) dochází k jejich uvolňování, působí na hladkosvalové buňky stěny cév, aktivují Ca-dependentní  $K^+$  kanály, dochází k výstupu  $K^+$  z buňky, a tím pádem hyperpolarizaci membrány a relaxaci hladkosvalové buňky, což je podkladem vazodilatačního potenciálu EETs (obr. 4) (Fan *et al.* 2015; Imig 2019; Roman 2002).

### Vylučování sodíku

EETs blokují epiteliální sodíkový kanál (ENaC) v kortikálním sběrném kanálku ledvin, čímž inhibují zpětné vychytávání  $Na^+$  v této části glomerulu, zároveň inhibují  $Na^+/H^+$  kotransportér (NH-3) v proximálním tubulu. Oběma těmito mechanismy přispívají k vyšší natriuríze a regulaci krevního tlaku (obr. 5) (Capdevila & Wang 2013; Fan *et al.* 2015; Hye Khan *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014; Wei *et al.* 2004, 2006).

### Kardioprotektivní účinky

Gen CYP2J2 kóduje hlavní epoxygenázu produkující EETs v lidských kardiomyocytech, u transgenních zvířat se zvýšenou expresí tohoto genu nebo se sníženou expresí sEH (zodpovědné za degradaci EETs) byl pozorován protektivní účinek vůči síňovým i komorovým arytmiím indukovaným různými způsoby (ischemicko-reperfuzní, objemové přetížení, hypertrofie,  $\beta$ -adrenergní stimulace) (Chaudhary *et al.* 2013; Li *et al.* 2020; Westphal *et al.* 2013; Wu *et al.* 1996). Byl prokázán i příznivý vliv na rozsah infarktu myokardu, regeneraci myokardu po ischémii i zmírnění ischemicko-reperfuzního poškození (Gauthier *et al.* 2007; Neckář *et al.* 2018; Nithipatikom *et al.* 2006). K těmto kardioprotektivním účinkům dochází přes ATP-senzitivní  $K^+$  kanály, Ca-dependentní  $K^+$  kanály a fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) (Chaudhary *et al.* 2013; Gross *et al.* 2013; Westphal *et al.* 2013). Zároveň se EETs podílejí na angiogenezi, a tím přispívají k regeneraci poinfarktového myokardu (Imig *et al.* 2022; Zhao *et al.* 2018).

## 1.4.6.2. 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina

Oproti EETs jsou účinky 20-HETE na kardiovaskulární systém komplexnější, protože jednak působí vazokonstrikčně a má tím pádem hypertenzní potenciál, na druhou stranu v ledvinách zvyšuje natriurízu.

### Vaskulární účinky

20-HETE je významný vazokonstriktor v periferním a renálním řečišti, kde působí zejména na aferentní arterioly a snižuje filtrační tlak v glomerulu, činí tak inhibicí Ca-dependentních  $K^+$  kanálů a zvýšenou vodivostí pro vápníkové kanály typu L, což ve

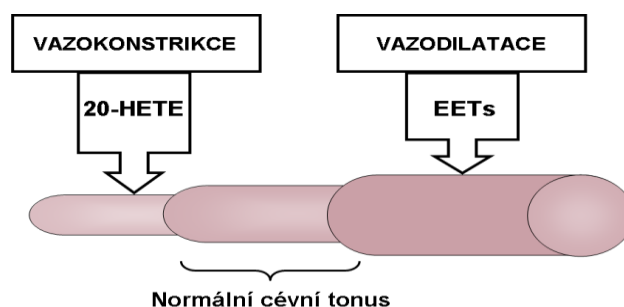
výsledku vede ke zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$ , depolarizaci hladkosvalových buněk a tedy k vazokonstrikci (obr. 4) (Williams *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2018). Mimo tento přímý vazokonstrikční efekt potencuje 20-HETE vaskulární reaktivitu pro ANG II a ET-1, což dále přispívá k vazokonstrikci (Alonso-Galicia *et al.* 2002; Imig 2019). Zároveň bylo zjištěno, že ANG II i ET-1 stimulují v periferních a renálních cévách produkci 20-HETE, což nabývá klinického významu zejména u stavů s chronicky aktivovaným RAAS a ET, jako např. u CHSS (Cheng *et al.* 2012). V preklinických animálních studiích na různých hypertenzních modelech bylo prokázáno, že chronická blokáda 20-HETE má významné antihypertenzní účinky (Gawrys *et al.* 2020; Joly *et al.* 2006; Kaergel *et al.* 2002; Sedláková *et al.* 2018).

### Renální účinky

Oproti pro-hypertenzním vaskulárním účinkům 20-HETE nejsou ty renální tak jednoznačné. 20-HETE zvyšuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby, a tím potencuje snížení GFR způsobené primárně vazokonstrikčním účinkem na aferentní arteriolu, a to podporuje retenci sodíku v organismu (Roman 2002; Zou *et al.* 1994).

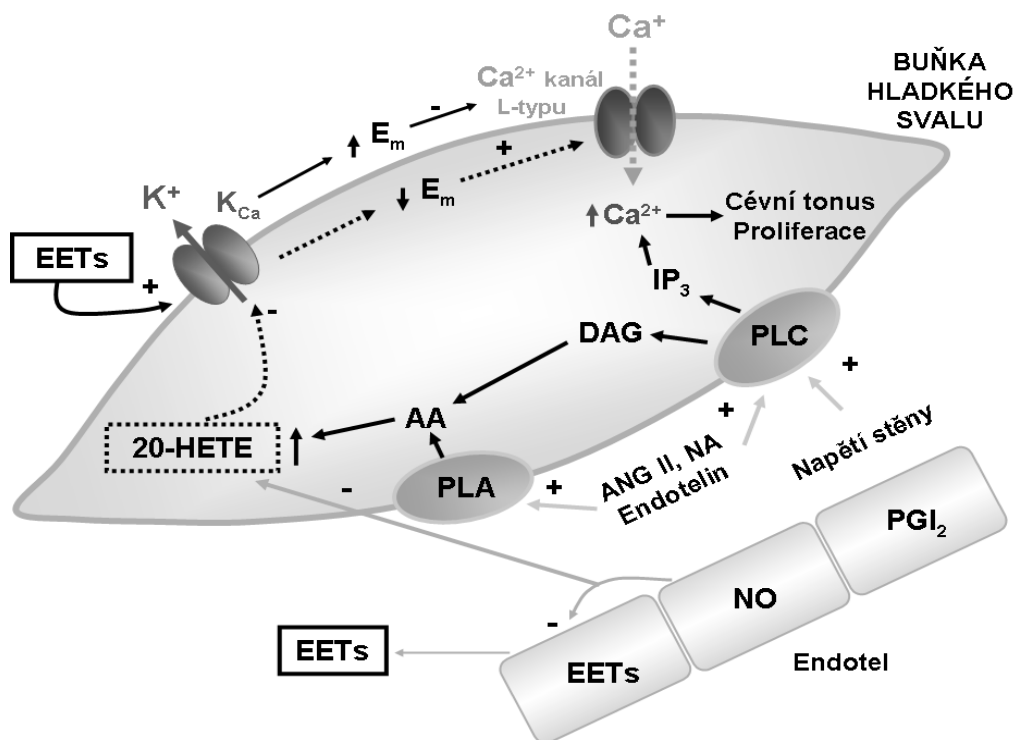
Na druhou stranu v proximálním tubulu 20-HETE inhibuje reabsorpci sodíku z primární moče přes blokádu  $Na^+-K^+$  ATPázy (Roman 2002), zároveň blokuje reabsorpci sodíku v Henleově klíče inhibicí primárně  $K^+$  kanálu v luminální membráně, a tím sekundárně  $Na^+-K^+-2Cl^-$  kotransport v tlusté části vzestupného raménka Henleovy klíčky (obr. 5). Těmito mechanismy se významně podílí na udržování natriurézy (Roman 2002; Wang *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2018).

U experimentálních i genetických modelů hypertenze, srdečního i renálního selhání, je produkce a rovnováha EETs a 20-HETE narušena. Proto se předpokládá, že správně zvolené farmakologické ovlivnění těchto drah by mohlo vést k novým potenciálním terapeutickým možnostem (Fan *et al.* 2015; Imig *et al.* 2022; Van Dokkum *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2018).

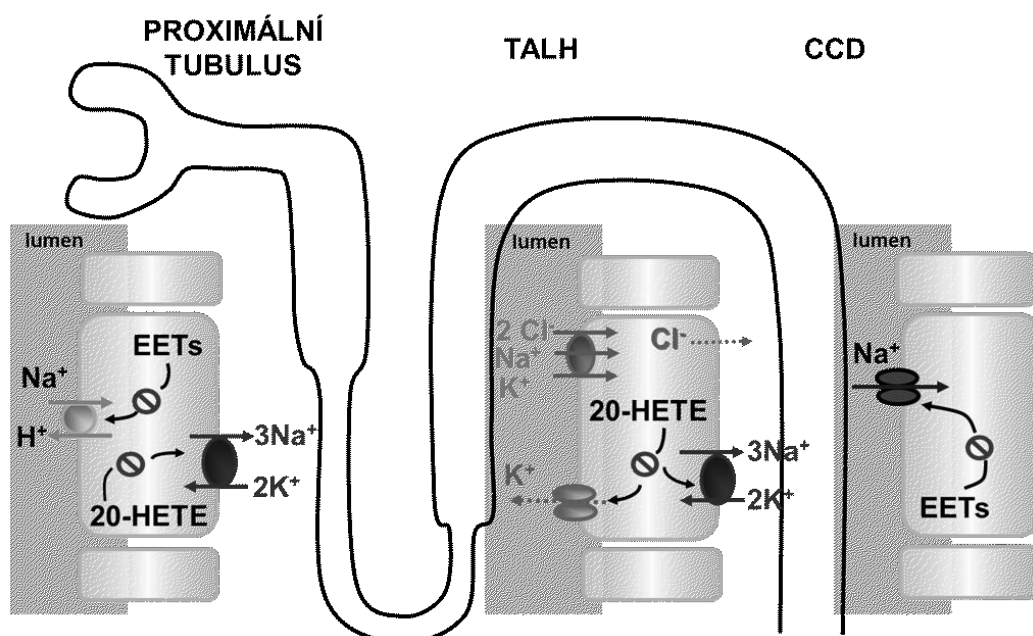


Obr. 3 Vaskulární účinky EETs a 20-HETE





Obr. 4 Mechanizmy působení EETs a 20-HETE na buňku hladkého svalu (upraveno dle Zhang et al. 2018) PLA – fosfolipáza A, PLC – fosfolipáza C, PGI<sub>2</sub> – prostaglandin I<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub> – inositoltrifosfát, DAG – diacylglycerol,  $E_m$  – membránové napětí



Obr. 5 Mechanizmy působení EETs a 20-HETE na nefron (upraveno dle Zhang et al. 2018). TALH – tlustý segment vzestupného raménka Henleovy kličky, CCD – korová část sběracího kanálku

## 2. Hypotéza disertační práce

Na základě výše zmíněných aktuálních znalostí předpokládáme, že *zvýšení tkáňové dostupnosti EETs, navozené podáváním analogu EETs (EET-A) nebo inhibicí sEH (sEHi), zmírní rozvoj kardiální a renální dysfunkce a zlepší průběh a přežívání animálního CHSS.*

## 3. Cíle disertační práce

Cílem našeho preklinického projektu bylo *prokázat snížení tkáňové (kardiální a renální) dostupnosti biologicky aktivních EETs u animálního modelu CHSS (ACF TGR) a zhodnotit vliv farmakologických možností ovlivnění tohoto systému na přežívání, kardiální a renální funkce:*

- 1) ACF TGR + monoterapie **EET-A** vs. monoterapie **ACEi**, vs. kombinovaná terapie **ACEi + EET-A** a vs. **placebo** (voda)
- 2) ACF TGR + kombinovaná terapie **ACEi + sEHi** vs. monoterapie **ACEi** a vs. **placebo** (voda)

Dalším cílem bylo *zhodnotit pohlavní rozdíly v odpovědi na léčbu ACF TGR kombinovanou terapií ACEi + sEHi.*

## 4. Metody a materiál

### 4.1. Pokusná zvířata

#### 4.1.1. HanSD a TGR(Ren2)27 potkani

Potkani TGR(Ren2)27 (dále TGR) byli vyšlechtěni z Hannover Sprague-Dawley potkanů (dále HanSD) metodou mikroinjekce DBA/2J Ren2 úseku transgenní DNA (myší gen pro renin) do zralého čerstvě oplodněného oocytu HanSD potkana (Mullins *et al.* 1990). Jedná se o experimentální model maligní hypertenze, homozygotní jedinci začínou ve čtyřech týdnech věku rozvíjet hypertenzi, která dosahuje maximálních hodnot v devátém týdnu věku zvířat (systolický krevní tlak až 300 mmHg) a krátce poté začne docházet k rozvoji levostranného srdečního selhání (De Boer *et al.* 2004).

Vzhledem k tomu, že jsme se v našich projektech nezaměřovali přímo na zkoumání patofyziologie rozvoje srdečního selhání na podkladě extrémní aktivace RAAS, používali jsme heterozygotní zvířata, která vznikla zkřížením transgen-negativní HanSD samice s homozygotním TGR samcem a která rozvíjejí mírnější hypertenzi s maximálním systolickým krevním tlakem ve věku devíti týdnů kolem 240 mmHg a nedochází u nich k srdečnímu selhání (Opočenský *et al.* 2004).

Vložený gen Ren2 je lokalizován na autozomálním chromozomu, proto hypertenzi vyvinou obě pohlaví, ačkoliv jsme v předchozích pracích naší laboratoře pozorovali výrazný pohlavní dimorfismus. Samci rozvíjejí hypertenzi průměrně o 30–40 mmHg vyšší (Opočenský *et al.* 2004). Ve snaze předejít výkyvům ve sledovaných parametrech vlivem estrálních cyklů samic jsme v našich pokusech používali samce, jak HanSD, tak TGR, vyjma práce zkoumající pohlavní rozdíly v účinnosti terapie sEHi na průběh CHSS.

Všechna zvířata byla chována na základě platných směrnic a zavedené praxe v Centru experimentální medicíny Institutu Klinické a Experimentální Medicíny (IKEM, Praha), pocházela z chovných párů poskytnutých z Max Delbrück Center for Molecular Medicine (Berlin, Německo). Zvířata byla chována v cyklu světlo/tma (12 h světlo a 12 h tma) a krmena standardní normoslanou, normoproteinovou dietou (0,45% NaCl, 19–21% obsah proteinů) vyrobenou firmou SEMED (Praha, ČR) pro laboratorní potkany.

### 4.2. Chemikálie a metody

**Inhibitor ACE (ACEi):** pro inhibici angiotenzin konvertujícího enzymu jsme použili běžně dostupné, klinicky užívané a ve vodě rozpustné farmakum Gopten 2 mg

(Abbot, Praha, ČR) s účinnou látkou trandolapril, které bylo podáváno potkanům v pitné vodě *ad libitum*, v koncentraci 6 mg/l. Tato koncentrace byla v předešlých pracích naší laboratoře validovaná jako dostatečná k inhibici RAAS u tohoto modelu (Jichová *et al.* 2016).

**Analog 14,15-epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A):** chemickým vzorcem sodium 2-(Z-(13-(3-pentyl)ureido)-tridec-8-enamido) malonát je zavedený analog EETs, vhodný pro *in vivo* experimenty (Imig *et al.* 2010). Podává se také v pitné vodě, v koncentraci 10 mg/kg tělesné hmotnosti, jejíž účinnost byla ověřena farmakokinetickými a následně *in vivo* studiemi (Falck *et al.* 2009; Hye Khan *et al.* 2014; Imig 2010; Walkowska *et al.* 2021).

**cAUCB (sEHi):** chemickým vzorcem cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)cyclohexyloxy] benzoová kyselina, inhibitor sEH, jehož roztok jsme připravili rozpuštěním 26 mg krystalického cAUCB a 150 mg (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrinu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) v 5 ml etanolu (Penta, Praha, ČR). Roztok jsme 5 min sonikovali a poté doplnili do litru. Pro zachování zásaditého pH roztoku jsme přidali hydrogen uhličitán sodný (3 ml/l). Roztok byl podáván v pitné lahvi *ad libitum*. Tento protokol přípravy i dávka byly používány i v předešlých studiích naší laboratoře (Honetschlägerová *et al.* 2011a, 2011b; Sporková *et al.* 2011), v nichž jsme si ověřili, že koncentrace cAUCB je pro inhibici sEH dostatečná.

#### **4.2.1. Stanovení hladin ANG II, EETs, DHETs, 20-HETE v plazmě, v ledvině a v levé komoře srdeční**

Zvířata byla usmrcena dekapitací, plná krev byla sbírána do předchlazené zkumavky (4 °C) s příslušnými inhibitory (5 mM EDTA, 10  $\mu$ M pepstatin, 1,25 mM 1,10-fenantrolin, 20  $\mu$ M enalapril). Vyizolované ledviny a srdce byly osušeny a zváženy. Tkáň z levé komory srdeční (LK) a jedné ledviny byla použita pro stanovení koncentrace ANG II. Ledvina a LK byly zhomogenizovány v předchlazeném metanolu. Vzorky krve i homogenátů tkání byly centrifugovány 10 min při 3 000 x g a 4 °C. Plazma byla vysrážena předchlazeným etanolem (4 °C) a centrifugována 10 min při 3 000 x g a 4 °C.

Supernatanty ze vzorků krve i tkání byly odpařeny ve vakuové centrifuze (SpeedVac Concentrator SPD101B, Savant Instruments, New York, USA) a uloženy při -80 °C před vlastním stanovením ANG II. Rekonstituované odparky ledvinných homogenátů byly přečištěny na SPE kolonkách. Získané eluáty byly opět odpařeny a uchovány při -80 °C.

Plazmatická, renální a srdeční koncentrace ANG II byla měřena radioimunologicky pomocí komerčního kitu (Euro-Diagnostika Co., Malmö, Švédsko) (Kopkan *et al.* 2005).

Koncentrace EETs, DHETs a 20-HETE v kůře ledvin a LK byla stanovena metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (HPLC – MS/MS) (Imig 2005) firmou Lipidomix GmbH (Berlin, Německo).

#### 4.2.2. Stanovení albuminu v moči

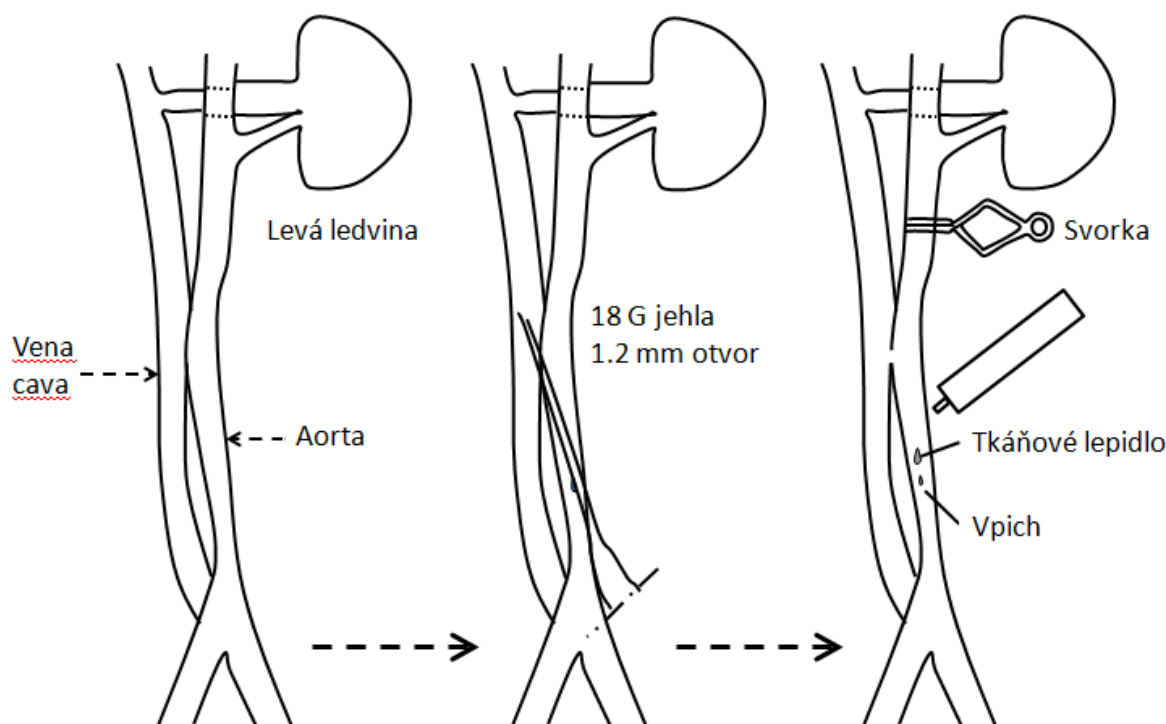
Koncentrace albuminu v moči potkanů byla měřena pomocí komerčně dodávaného kitu Rat Albumin ELISA Kit (AssayPro, St. Charles, MO, USA).

#### 4.2.3. Stanovení proteinových expresí CYP4A, CYP2C23 epoxygenázy a sEH v kůře ledvin a v levé komoře srdeční

Proteinové exprese CYP4A, CYP2C23 a sEH (prim. protilátky: ab140635, ab53944, ab96695, ABCAM, Cambridge, UK) byly stanovovány metodou Western blotu (Huang *et al.* 2007). Intenzita výsledných bandů byla hodnocena denzitometricky a normalizována na kontrolní protein  $\beta$ -aktin (prim. protilátka: ab8227, ABCAM, Cambridge, UK).

#### 4.2.4. Aorto-kavální píštěl

Aorto-kavální píštěl (ACF) byla vytvořena mikrochirurgicky punkční cestou dle Garcii a Diebolda (Garcia & Diebold 1990), dle zavedeného protokolu v naší laboratoři (Melenovsky *et al.* 2011, 2012) (obr. 6).



Obr. 6 Schéma mikrochirurgického vytvoření aorto-kavální píštěle u potkana

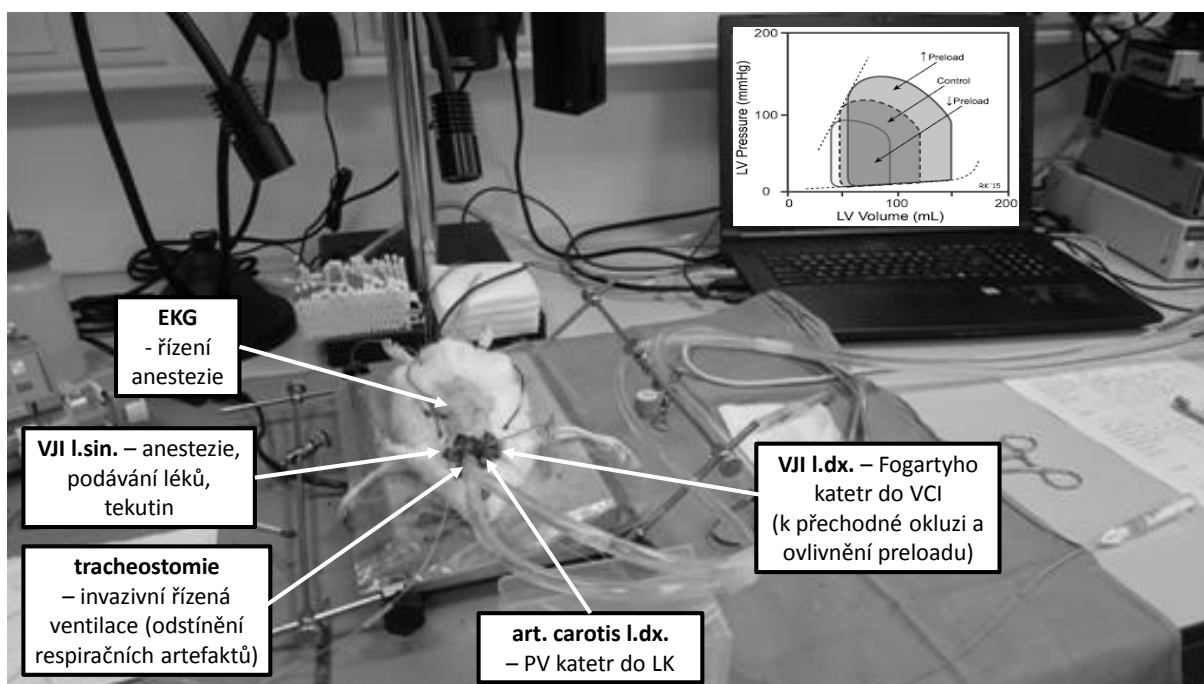
#### 4.2.5. Echokardiografie

Echokardiografické vyšetření bylo prováděno na anestetizovaných potkanech (Thiopental, VAUB Pharma, ČR, dávka 50 mg/kg) bezprostředně před invazivní tlakově-objemovou analýzou levé komory srdeční. Před vyšetřením byli potkani zváženi, oholeni na ventrální a levé laterální části hrudníku a umístěni na vyhřívanou operační desku k udržení tepelného komfortu. Standardní srdeční parametry byly měřeny v M-modu či B-modu z parasternální dlouhé osy, parasternální krátké osy v úrovni papilárních svalů a čtyřdutinové apikální projekce, dle zavedeného protokolu v naší laboratoři (Pokorný *et al.* 2019). Měřené morfologické parametry zahrnovaly tloušťku přední a spodní stěny LK, vnitřní systolický a diastolický rozměr LK, velikost levé síně, intersystolický interval, rozměr anulu trikuspidální chlopně (RVD1), rozměr pravé komory (PK) v její polovině délky (RVD2), plochu PK v systole a diastole, a rozměr dolní duté žíly. Z naměřených parametrů byly vypočítány standardizovanými a validovanými vzorci objem LK v systole a diastole (Teichholzova formule), ejekční frakce LK (EFLK), frakční zkrácení LK (FSLK), frakční změna plochy PK (FAC), tepová frekvence, systolický objem, srdeční výdej, odhad hmotnosti LK s následnou indexací na délku tibie. Všechna echokardiografická měření byla prováděna na animálním ultrazvukovém přístroji Vevo® 2100 Imaging System se sondou MS250S (13–24 MHz), (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, ON, Canada).

#### 4.2.6. Tlakově-objemová analýza levé komory srdeční

Invazivní tlakově-objemová analýza levé komory srdeční (pressure-volume analýza, P-V analýza) byla prováděna bezprostředně po echokardiografickém vyšetření na stále iniciálně anestetizovaných potkanech. Potkan byl po celou dobu na vyhřívané operační desce napojen na třísvodové povrchové EKG, pomocí takto změřené srdeční frekvence byla dále řízena hloubka anestézie. Při vlastní P-V analýze je nejprve zaveden katetr do levé vnitřní jugulární žíly, pomocí něhož je možné podávat léky, či tekutiny, poté je provedena tracheostomie a potkan je napojen na objemově řízenou umělou plicní ventilaci – po podání myorelaxancia (Rocuronium, B. Braun Melsugen, Německo) lze krátkodobě eliminovat dechové pohyby k zaznamenání P-V křivek. Poté je cestou pravé vnitřní jugulární žíly zaveden Fogartyho balónkový katetr (Fogarty Catheter, Edwards Lifesciences, Irvine, USA) a pod ultrazvukovou kontrolou uložen do dolní duté žíly pod úroveň bránice, pomocí nafukování a vyfukování balónku je možné regulovat preload a při simultánně zavedeném P-V katetru v LK měřit dynamické systolické a diastolické

parametry LK. Nakonec je přes pravou karotickou tepnu zaveden P-V katetr (Millar Mikro-Tip® rat PV catheter, ADInstruments, Bella Vista, Austrálie) retrográdně do LK, ideální polohy uprostřed LK je docíleno ultrazvukovou kontrolou. Protokol přípravy P-V analýzy a samotné hemodynamické měření parametrů LK byl převzat dle původní práce na potkanech (Pacher *et al.* 2008) (obr. 7). Po skončení měření byl pokus ukončen předávkováním zvířete vysokou dávkou thiopentalu, který způsobil bezbolestné a nestresující utracení.



Obr. 7 Příprava P-V analýzy

#### 4.2.7. Měření průtoku krve ledvinou, glomerulární filtrace a natriurézy

Zvířata anestetizovaná intraperitoneálně podaným thiopentalem (50 mg/kg, VUAB pharma, Roztoky, ČR) byla uložena na termoregulační operační stolky. Následně byla provedena tracheostomie pro zajištění volného dýchání. Na tracheální trubičku byl nasazen nástavec s přívodem 95% kyslíku, 5% oxidu uhličitého. Cestou pravé jugulární žíly byl zaveden PE-50 katetr za účelem infuze fyziologického roztoku (0,9% NaCl, B. Braun, Melsungen, Německo) doplněného o bovinní albumin (6%, Sigma Chemicals Co, Praha, ČR), k zajištění dostatečného zavodnění organismu a podávání anestetik. Cestou pravé femorální arterie v oblasti třísla byl zaveden PE-50 katetr pro invazivní monitorování krevního tlaku během pokusu (PowerLab/4SP, ADInstruments, Bella Vista, Austrálie) a pro odebírání vzorků krve v jednotlivých experimentálních periodách. Potkanovi byla

izolována levá ledvina a na levou renální arterii byla nasazena průtoková sonda (1RB, Transonic Systems, Altron Medical Electronic GmbH, Německo) pro měření průtoku krve ledvinou. Následně byl katetrizován i levý močovod PE-10 katetrem pro sběr moči.

Po postoperační ekvilibraci (50 min) byl potkanovi vyměněn infuzní roztok fyziologického roztoku za roztok s albuminem a polyfruktosanem inulinem (7,5%, Inutest, Laevosan, Linz, Rakousko) pro stanovení GFR v jednotlivých částech pokusu. Celkem probíhaly 4 clearencové periody po 30 minutách, během kterých byl měřen střední arteriální tlak, PKL a odebírali se vzorky moče a krve na stanovení hodnot GFR, vylučování sodíku a množství vyloučené moče.

Míra GFR byla měřena kolorimetricky pomocí podávaného polyfruktosanu. Objem vyloučené moče byl měřen gravimetricky, během každé sledované periody. Z těchto vzorků bylo posléze stanoveno množství vyloučeného sodíku metodou plamenové fotometrie (BWB-BIO Flame Photometer, BWB Technologies Ltd. Newbury, UK). Pokus byl ukončen předávkováním zvířete vysokou dávkou thiopentalu, který způsobil bezbolestné a nestresující utrčení (Červenka *et al.* 2015a, 2015b; Honetschlägerová *et al.* 2011b).

#### **4.2.5. Statistická analýza**

Statistická analýza byla prováděna pomocí programu Graph-Pad Prism 8 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA). K porovnání přežívacích křivek byl použit log-rank (Mantel-Cox) test následovaný Gehan–Breslow–Wilcoxon testem. Všechny ostatní výsledky byly porovnány one-way ANOVA testem. Výsledky jsou uvedeny jako průměr +/- standardní chyba průměru (mean +/- SEM); s hodnotou  $p < 0,05$  stanovující statistickou významnost.



## 5. Analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A)

EETs jsou parakrinní látky s významnými vazodilatačními a natriuretickými účinky (viz. výše) a prokázanými kardio- a renoprotektivními vlastnostmi (Elmarakby 2012; Fan & Roman 2017; Imig 2019; Imig *et al.* 2022; Lai & Chen 2021). V našich předchozích projektech jsme prokázali sníženou renální dostupnost aktivních EETs u modelu ACF TGR při rozvinuté renální insuficienci s porušenou renální hemodynamikou (Sporková *et al.* 2017; Vacková *et al.* 2019).

Cílem naší práce bylo zkoumat vliv syntetického perorálně aktivního analogu EET (EET-A) na rozvoj a průběh srdečního selhání, včetně vlivu na renální dysfunkci (tzv. kardiorenální syndrom).

### 5.1. Série 1: Hodnocení aktivity RAAS, SNS a CYP metabolitů a enzymů v časných fázích srdečního selhání u ACF TGR

Hlavním cílem bylo zhodnotit stupeň systémové (plazmatické) a intrarenální aktivace obou větví RAAS a SNS v časně fázi rozvoje srdečního selhání navozeného ACF, dalším cílem bylo vyhodnocení aktivace CYP-450 epoxygenázových a  $\omega$ -hydroxylázových drah v ledvinách a v LK srdeční.

Hypertenzní (TGR) a normotenzní (HanSD) potkani ve věku 8 týdnů podstoupili ACF proceduru nebo operaci bez vytvoření ACF ("sham", kontrolní). V každé skupině bylo 12 zvířat.

1. Kontrolní HanSD potkani
2. Kontrolní TGR
3. ACF TGR

Po 2 týdnech byla zvířata dekapitována s bezprostředním odběrem plazmy, ledvin a srdce. Měřena byla plazmatická a renální koncentrace ANG II, ANG 1-7, NA, tkáňová koncentrace EETs, DHETs, 20-HETE a proteinová exprese enzymů CYP4A1, CYP2C23 a CYP2J3 v ledvinách a v LK.

#### Výsledky

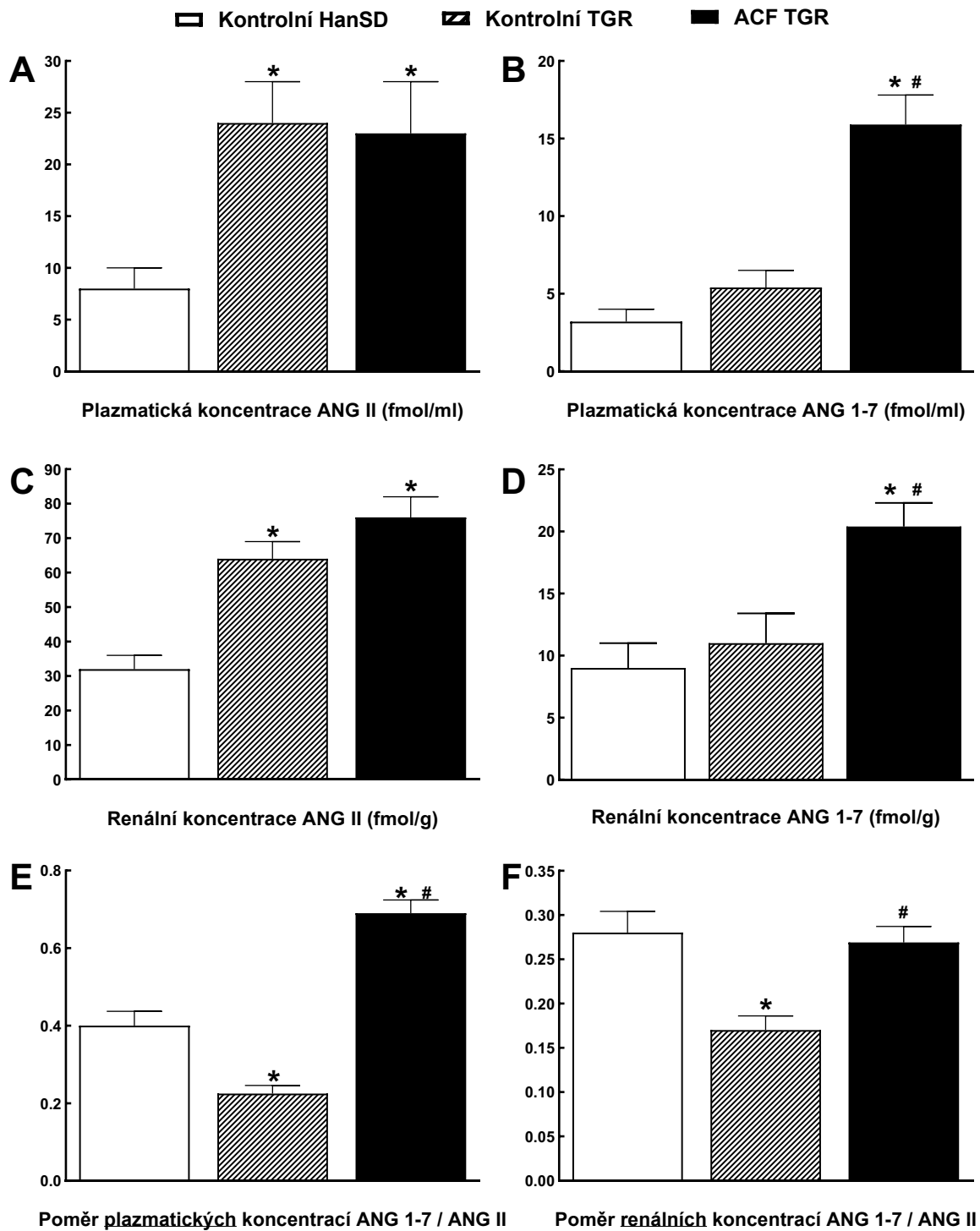
Vyšší plazmatické a renální hladiny ANG II, které byly pozorovány u TGR kontrolních potkanů oproti HanSD kontrolní skupině (graf 1 - A, C), a zároveň srovnatelné koncentrace ANG 1-7 u TGR kontrol a HanSD kontrol svědčí pro porušenou systémovou a

intrarenální rovnováhu mezi vazodilatační a vazokonstrikční osou RAAS (graf 1 - B, D), vyjádřeno poměrem ANG 1-7 / ANG II, ve směru hyperaktivace vazokonstrikční dráhy (graf 1 - E, F). Vytvořením ACF u TGR potkanů došlo k výraznější aktivaci vazodilatační osy RAAS a ke zvýšení plazmatické i renální koncentrace ANG 1-7 (graf 1).

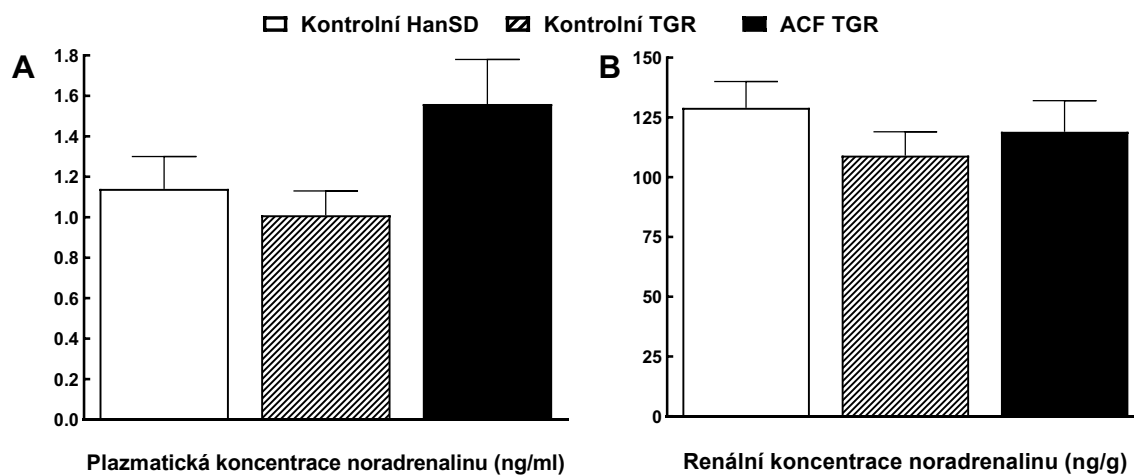
S ohledem na aktivaci SNS nebyl mezi skupinami pozorován významný rozdíl v plazmatických či renálních koncentracích NA (graf 2).

Zároveň nebyl zjištěn významný rozdíl v koncentraci 20-HETE či proteinové expresi CYP4A1 v srdeční (graf 3 - A, B) a v ledvině tkáni (graf 3 - C, D), což naznačuje, že mezi skupinami nebyl rozdíl v aktivitě CYP-450-dependentní  $\omega$ -hydroxylázové cestě metabolismu AA.

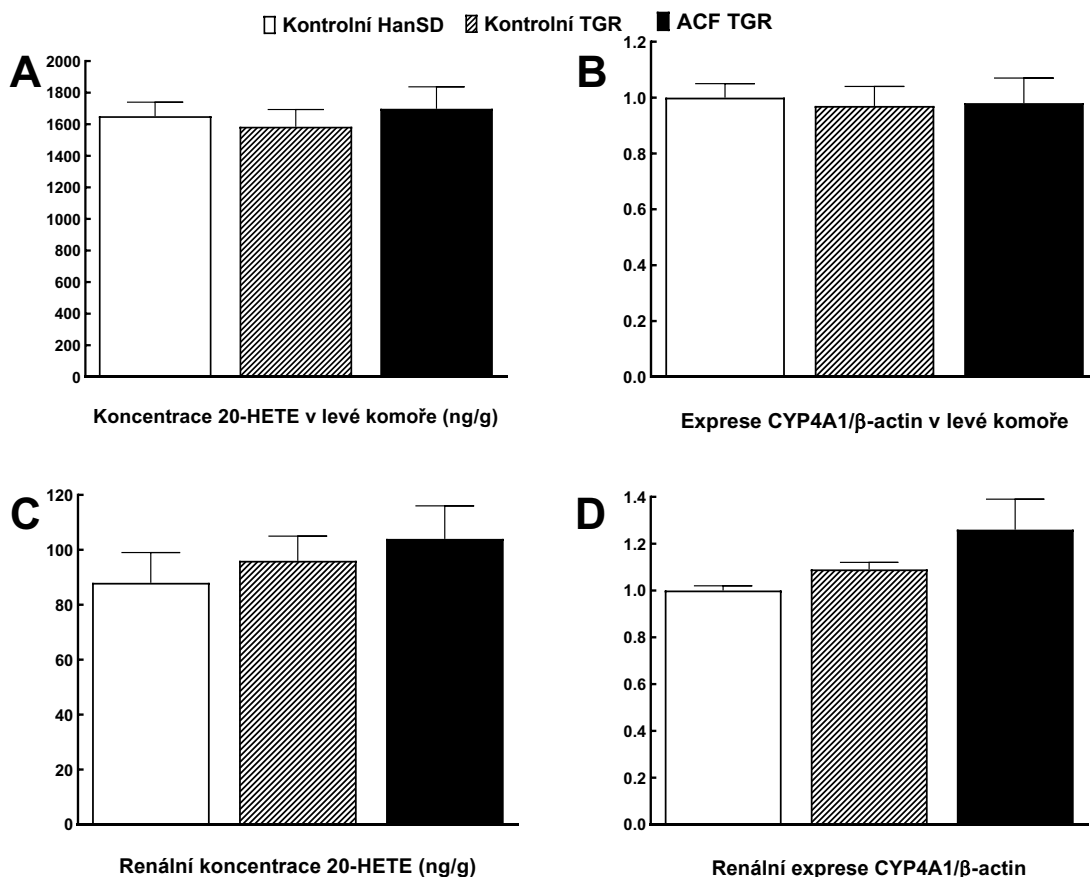
Naopak byl pozorován významný rozdíl v aktivitě CYP-dependentní epoxygenázové cestě metabolismu AA. V ledvině i v LK byla snížena zejména koncentrace 11,12-EETs a 14,15-EETs (graf 4 - A, C), která byla doprovázena významným zvýšením jejich biologicky inaktivních metabolitů (DHETs). Biologická dostupnost aktivních EETs, daná poměrem EETs / DHETs, byla v ledvině i v LK snížena o 65 % u skupiny TGR ACF oproti TGR kontrolám (graf 4 - B, D). Proteinová exprese enzymu zodpovědného za produkci EETs nebyla v ledvině ani v LK TGR ACF oproti TGR kontrolám významně ovlivněna (graf 4 - E, G), ale v LK TGR ACF byla oproti TGR kontrolám významně vyšší exprese proteinu sEH, enzymu dominantně degradujícího EETs na inaktivní DHETs (graf 4 - F).



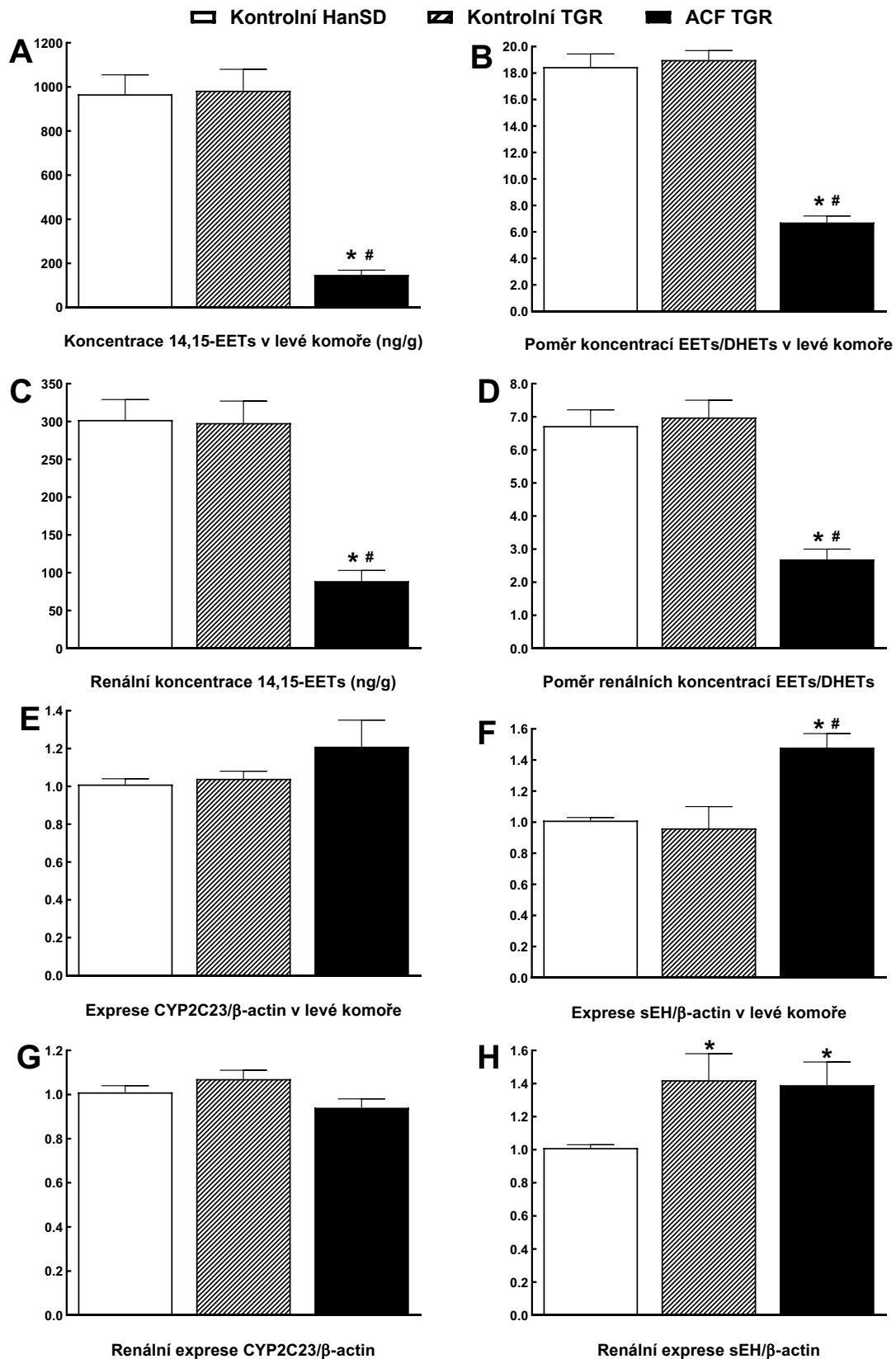
Graf 1. Aktivace vazokonstrikční a vazodilatační osy RAAS u ACF TGR oproti kontrolním HanSD a TGR 2 týdny po ACF / sham proceduře. \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$



Graf 2. Aktivace systémového a renálního SNS u ACF TGR oproti kontrolním HanSD a TGR 2 týdny po ACF / sham proceduře



Graf 3. Aktivace  $\omega$ -hydroxylázové cesty metabolismu AA v levé komoře srdeční a v ledvině u ACF TGR oproti kontrolním HanSD a TGR 2 týdny po ACF / sham proceduře



Graf 4. Aktivace epoxyeikosatrienového systému a tkáňová dostupnost EETs v levé komoře srdeční a v ledvině u ACF TGR oproti kontrolním HanSD a TGR 2 týdny po ACF / sham proceduře. \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$

## **5.2. Série 2: Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na srdeční funkce u ACF TGR**

Zvířata byla připravena stejně jako v předchozí sérii. Ve dne 0 (2 týdny po ACF / sham proceduře) byla zvířata rozdělena do terapeutických skupin a byla započata dvoutýdenní léčba. Poté (týden 2, tj. 4 týdny po ACF / sham proceduře) byli potkani anestetizováni thiopentalem sodným (50 mg/kg tělesné váhy), byla provedena echokardiografie, P-V analýza LK a po skončení pokusu byly zváženy orgány. Experimentální skupiny byly následující (v každé skupině 14 zvířat):

1. Kontrolní HanSD potkani
2. Kontrolní TGR
3. ACF TGR + voda (neléčení)
4. ACF TGR + EET-A
5. ACF TGR + ACEi
6. ACF TGR + EET-A + ACEi

### **Výsledky**

Data potvrdila, že TGR bez ACF rozvíjejí hypertrofii celého srdce i LK oproti HanSD bez ACF. Neléčení ACF TGR měli oproti TGR bez ACF výraznější bilaterální srdeční hypertrofii (celková váha srdce, i samostatné váhy LK, PK a síní). Navíc, neléčení ACF TGR vykazovali významně vyšší váhu plic než kontrolní TGR, což poukazuje na výraznou plicní kongesci. Monoterapie EET-A nenormalizovala žádný z těchto váhových parametrů u ACF TGR. Naopak monoterapie ACEi i kombinace ACEi s EET-A významně snížili celkovou váhu srdce, váhu LK, PK i plic až na úroveň kontrolních TGR (tabulka 1).

Echokardiograficky nebyl zjištěn významný rozdíl v systolických a diastolických rozměrech LK a PK mezi kontrolními HanSD a TGR, u těchto dvou skupin jsme nepozorovali rozdíl ani v hodnocení funkce LK a PK (ejekční frakce LK, frakční zkrácení LK, změna plochy PK, srdeční výdej), naopak jsme potvrdili výraznější koncentrickou hypertrofii - větší tloušťka přední i spodní stěny a relativní tloušťka stěn (relative wall thickness – RWT) u kontrolních TGR oproti kontrolám HanSD (tabulka 2).

Neléčení ACF TGR měli zvýšený systolický objem i srdeční výdej (důsledek píštěle), výrazně zvětšené rozměry LK i PK a snížená RWT, značící excentrickou hypertrofii. Echokardiograficky byla u ACF TGR patrná systolická dysfunkce LK (měřená ejekční frakcí a frakčním zkrácením LK) s neporušenou systolickou funkcí PK (měřeno

změnou plochy PK – fraction area change – FAC), oproti kontrolním TGR. Žádná z monoterapií nezabránila těmto změnám, kombinovaná terapie ACEi a EET-A zmírnila srdeční hypertrofii (tloušťku přední a spodní stěny) u ACF TGR oproti neléčeným ACF TGR (tabulka 2).

Invazivní P-V analýza LK ukázala vyšší maximální tlak v LK (graf 5 - A), vyšší míru vzestupu tlaku ( $(+dP/dt)_{max}$ ) (graf 5 - B), nižší míru poklesu tlaku ( $(-dP/dt)_{max}$ ) (graf 5 - D) a nižší relaxační konstantu  $\tau$  (graf 5 - F) u kontrolních TGR oproti kontrolním HanSD, ale stejný end-diastolický tlak a objem u těchto kontrolních skupin (graf 5 - C, E). Neléčení ACF TGR měli významně nižší maximální tlak v LK,  $(+dP/dt)_{max}$  i  $(-dP/dt)_{max}$ , dále snížený end-systolický tlakově-objemový vztah (ESPVR, graf 6 - A), předtížením modifikovanou systolickou práci (PRSW, graf 6 - D), sníženou celkovou periferní cévní rezistenci (TPR, graf 6 - B) a zvýšenou tenzi ve stěně LK (wall stress) oproti kontrolním TGR, žádná z terapií neměla vliv na tyto parametry. Navíc, neléčení ACF TGR vykázali výrazně zvýšený end-diastolický tlak v LK, end-diastolický objem LK a prodlouženou relaxační konstantu  $\tau$  v porovnání s kontrolními TGR, tyto parametry zlepšily všechny léčebné režimy (monoterapie ACEi, EET-A i jejich kombinace) (graf 5 - C, E, F).

**Tabulka 1.** Tělesná váha a váhy orgánů 4 týdny po ACF / sham proceduře, tj. 2 týdny na terapii (voda / ACEi / EET-A / EET-A + ACEi)

	Skupina					
	HanSD	TGR	ACF TGR	ACF TGR	ACF TGR	ACF TGR
	+ voda	+ voda	+ voda	+ ACEi	+ EET-A	+ EET-A + ACEi
Tělesná váha (g)	465 ± 7	487 ± 9	415 ± 9 <sup>‡</sup>	460 ± 16	453 ± 8	449 ± 7
Délka tibie (mm)	38.2 ± 0.3	37.7 ± 0.2	37.5 ± 0.2	37.8 ± 0.2	37.3 ± 0.3	37.4 ± 0.2
Váha srdce (mg)/délka tibie (mm)	37.69 ± 0.74	48.01 ± 0.98 <sup>*</sup>	68.27 ± 1.07 <sup>‡</sup>	54.49 ± 1.06 <sup>®</sup>	64.07 ± 1.19	56.69 ± 1.04 <sup>®</sup>
Váha LK (mg)/délka tibie (mm)	24.56 ± 0.21	33.69 ± 0.91 <sup>*</sup>	40.79 ± 0.89 <sup>‡</sup>	33.86 ± 0.24 <sup>®</sup>	38.07 ± 0.81	35.76 ± 0.26 <sup>®</sup>
Váha PK (mg)/délka tibie (mm)	7.28 ± 0.19	7.56 ± 0.21	14.69 ± 0.39 <sup>‡</sup>	11.95 ± 0.18 <sup>®</sup>	15.26 ± 0.43	11.69 ± 0.21 <sup>®</sup>
Váha LK (mg)/PK (mg)	0.296 ± 0.02	0.224 ± 0.01	0.361 ± 0.03 <sup>‡</sup>	0.353 ± 0.02	0.401 ± 0.09	0.327 ± 0.02 <sup>®</sup>
Váha plic (mg)/délka tibie (mg)	50.48 ± 1.06	48.52 ± 1.29	74.89 ± 1.43 <sup>‡</sup>	61.69 ± 1.17 <sup>®</sup>	68.48 ± 2.39	56.64 ± 1.23 <sup>®</sup>
Váha ledviny (mg)/délka tibie (mg)	39.27 ± 0.51	42.19 ± 1.29	40.35 ± 1.13	36.94 ± 1.44	39.04 ± 1.14	37.89 ± 0.71
Váha jater (mg)/délka tibie (mg)	455 ± 16	459 ± 17	435 ± 21	449 ± 24	464 ± 26	432 ± 29

Hodnoty jsou průměry ± SEM, LK = levá komora, PK = pravá komora.

\* P < 0,05 vs. kontrolní HanSD potkani; <sup>‡</sup> P < 0,05 vs. TGR + voda; <sup>®</sup> P < 0,05 vs. ACF TGR + voda

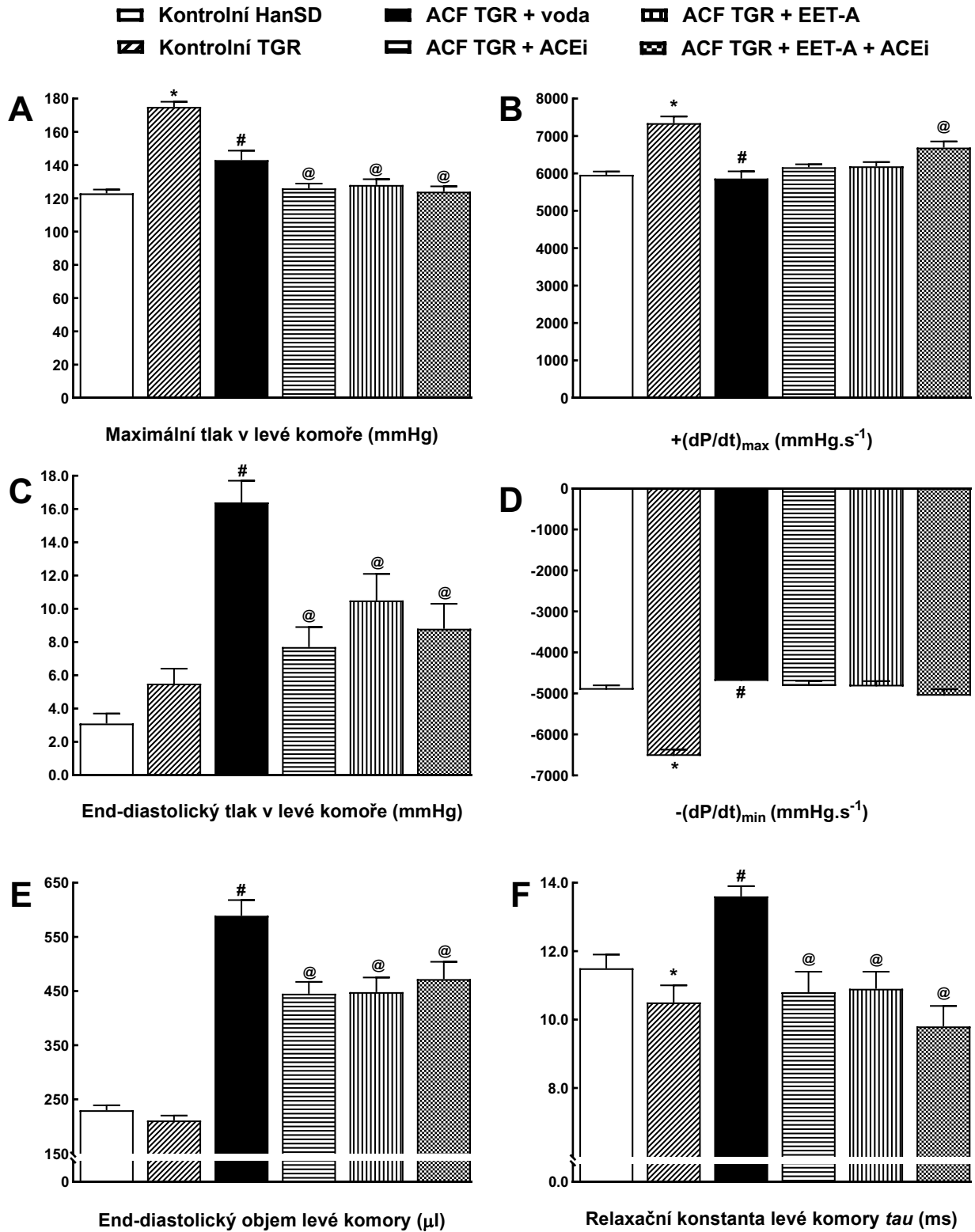
**Tabulka 2.** Echokardiografie 4 týdny po ACF / sham proceduře, tj. 2 týdny na terapii (voda / ACEi / EET-A / EET-A + ACEi)

	Skupina					
	HanSD	TGR	ACF TGR	ACF TGR	ACF TGR	ACF TGR
	+ voda	+ voda	+ voda	+ ACEi	+ EET-A	+ EET-A + ACEi
Tepová frekvence (min <sup>-1</sup> )	371 ± 11	376 ± 10	356 ± 9	368 ± 8	364 ± 8	354 ± 11
Diastolický rozměr LK (mm)	6.64 ± 0.13	6.14 ± 0.16	9.99 ± 0.24 <sup>‡</sup>	8.95 ± 0.21	9.83 ± 0.23	10.27 ± 0.25
Systolický rozměr LK (mm)	3.39 ± 0.16	2.99 ± 0.11	6.06 ± 0.27 <sup>‡</sup>	5.36 ± 0.21	6.01 ± 0.19	6.37 ± 0.21
Tloušťka přední stěny LK v diast. (mm)	2.06 ± 0.06	2.76 ± 0.04 <sup>*</sup>	2.18 ± 0.05 <sup>‡</sup>	2.08 ± 0.04	2.06 ± 0.05	1.68 ± 0.02 <sup>®</sup>
Tloušťka zadní stěny LK v diast. (mm)	2.22 ± 0.06	3.11 ± 0.08 <sup>*</sup>	2.47 ± 0.08 <sup>‡</sup>	2.39 ± 0.06	2.36 ± 0.06	1.87 ± 0.02 <sup>®</sup>
RWT LK	0.67 ± 0.02	1.02 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>‡</sup>	0.54 ± 0.03	0.48 ± 0.02	0.37 ± 0.02 <sup>®</sup>
Ejekční frakce LK (%)	78.2 ± 1.7	81.6 ± 0.9	67.2 ± 1.1 <sup>‡</sup>	66.8 ± 1.3	68.4 ± 1.4	65.2 ± 1.2
Frakční zkrácení LK (%)	48.5 ± 1.7	51.3 ± 0.8	39.6 ± 1.1 <sup>‡</sup>	40.3 ± 1.1	38.9 ± 1.1	37.6 ± 0.9
Systolický objem LK (μl)	179 ± 6.4	156 ± 9.9	379 ± 19.3 <sup>‡</sup>	303 ± 11	364 ± 18.4	376 ± 18.2
Srdeční výdej (ml/min)	60.9 ± 1.7	58.5 ± 3.6	133.6 ± 5.5 <sup>‡</sup>	111.5 ± 4.6	132.8 ± 6.8	139.5 ± 6.1
RVD1 (mm)	3.23 ± 0.08	3.19 ± 0.11	5.61 ± 0.36 <sup>‡</sup>	4.26 ± 0.26	4.79 ± 0.25	5.62 ± 0.18
RVD2 (mm)	3.07 ± 0.09	2.67 ± 0.14	5.01 ± 0.43 <sup>‡</sup>	3.88 ± 0.24	4.05 ± 0.20	5.28 ± 0.16
Frakční změna plochy PK (FAC) (%)	54.7 ± 1.9	55.7 ± 2.8	50.3 ± 2.9	49.4 ± 2.1	51.5 ± 3.2	44.1 ± 2.9

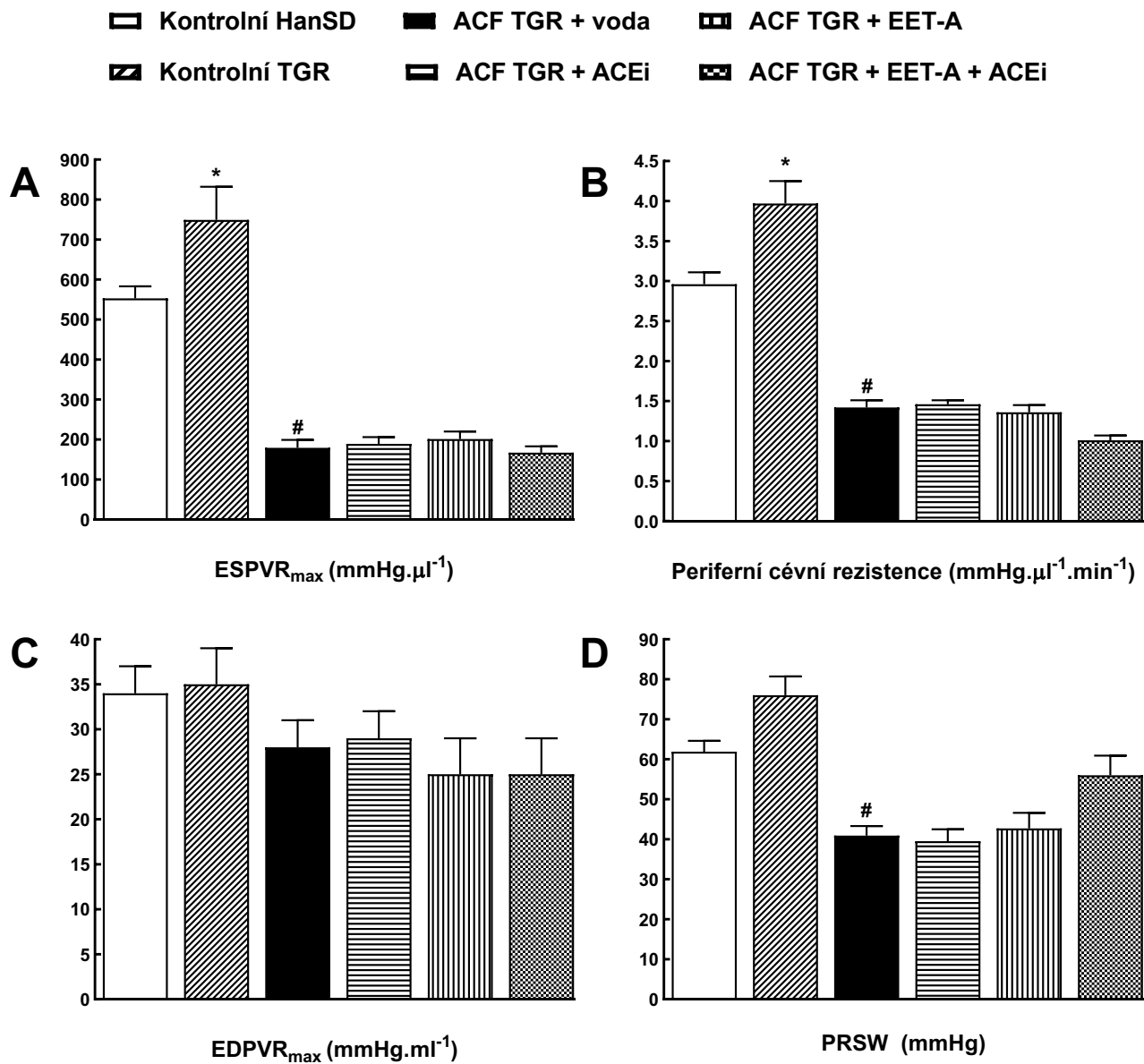
Hodnoty jsou průměry ± SEM, LK = levá komora, PK = pravá komora, RWT = relative wall thickness (relativní tloušťka stěny), RVD1 = diastolický rozměr PK u baze, RVD2 (diastolický rozměr PK v polovině komory).

\* P < 0,05 vs. kontrolní HanSD + voda; <sup>‡</sup> P < 0,05 vs. kontrolní TGR + voda; <sup>®</sup> P < 0,05 vs. ACF TGR + voda





Graf 5. Tlakově-objemová analýza levé komory 4 týdny po ACF / sham proceduře, tj. 2 týdny na terapii (část A). \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$ . @ vs. ACF TGR + voda,  $p < 0,05$



Graf 6. Tlakově-objemová analýza levé komory 4 týdny po ACF / sham proceduře, tj. 2 týdny na terapii (část B). \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$

### **5.3. Série 3: Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na renální hemodynamiku a na funkce ledvin u ACF TGR**

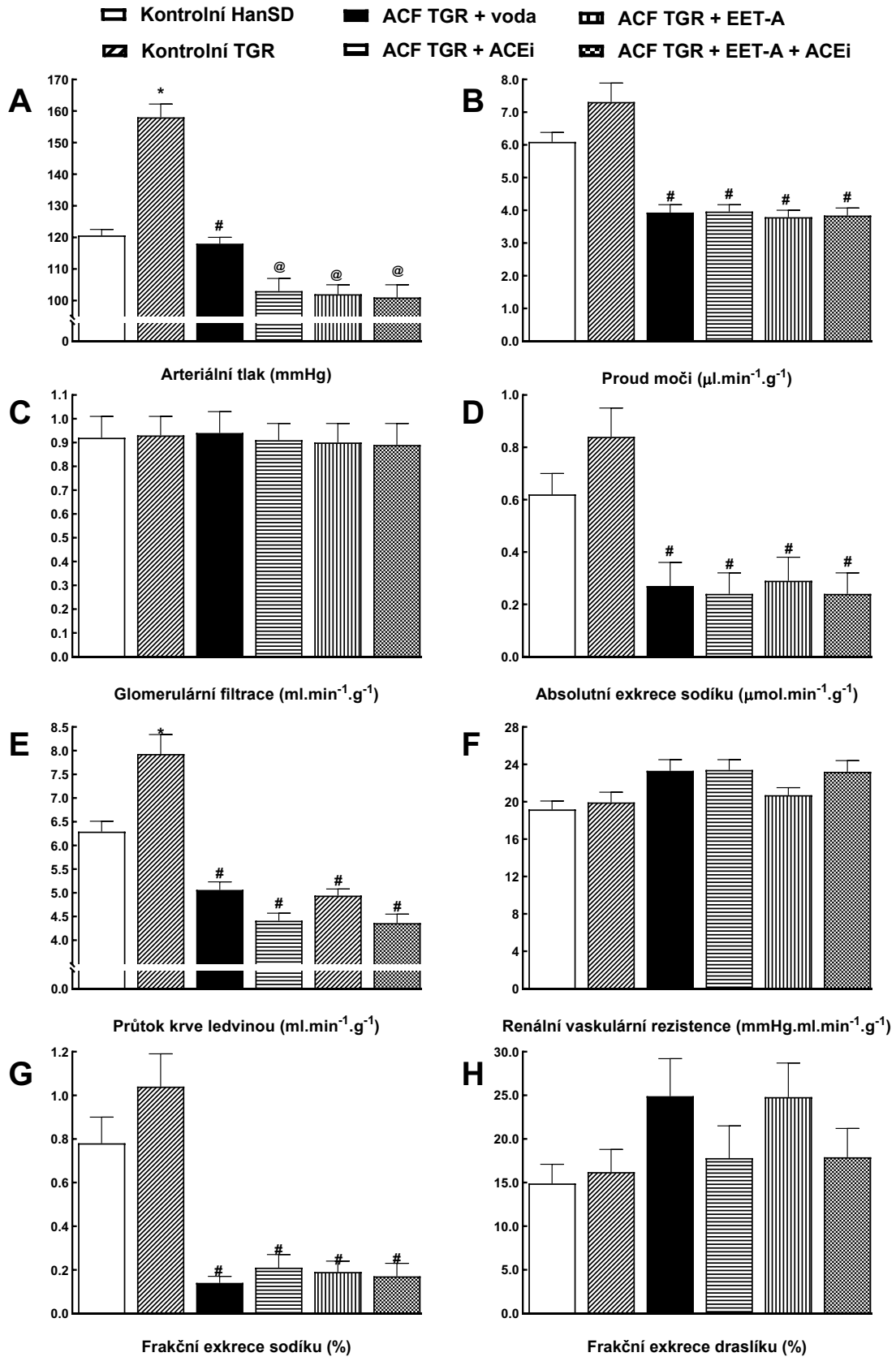
V této sérii byly zkoumány stejné experimentální skupiny po shodné přípravě jako v předchozí sérii (ACF / sham procedura ve dne -14, ve dne 0 zahájení terapie), v každé skupině bylo 12 zvířat:

1. Kontrolní HanSD potkani
2. Kontrolní TGR
3. ACF TGR + voda (neléčení)
4. ACF TGR + EET-A
5. ACF TGR + ACEi
6. ACF TGR + EET-A + ACEi

Po dvou týdnech léčby (den +14) byla zvířata anestetizovaná thiopentalem sodným (50 mg/kg tělesné váhy) a byl proved akutní clearancový pokus pro zhodnocení renální hemodynamiky a exkrečních parametrů (viz. výše).

#### **Výsledky**

Neléčení ACF TGR měli nižší střední arteriální tlak (MAP) než kontrolní TGR, podobný jako kontrolní HanSD. Všechny terapeutické režimy (monoterapie ACEi, EET-A i jejich kombinace) významně snížily arteriální tlak u ACF TGR na srovnatelné hladiny mezi sebou (graf 7 - A). Nebyl rozdíl mezi skupinami v míře glomerulární filtrace (GFR) (graf 7 - C). Neléčení ACF TGR vykázali výrazně snížený průtok krve ledvinou (PKL) (téměř 40 % relativní redukce), dále snížení diurézy, absolutní natriurézy i frakční exkrece sodíku oproti kontrolním TGR, čemuž žádný terapeutický režim významně nezabránil (graf 7 - B, D, E, G, H).



Graf 7. Renální hemodynamika a funkce 4 týdny po ACF / sham proceduře, tj. 2 týdny na terapii. \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$ . @ vs. ACF TGR + voda,  $p < 0,05$

## 5.4. Série 4: Vliv dlouhodobé monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na mortalitu, albuminurii a srdeční funkce u ACF TGR

Potkání samci byli připraveni dle stejného protokolu jako v předchozích sériích (ACF / sham procedura ve dne -14, ve dne 0 zahájení terapie) s následujícími experimentálními skupinami:

1. Kontrolní HanSD potkání (iniciální n = 20)
2. Kontrolní TGR (iniciální n = 21)
3. ACF TGR + voda (neléčení) (iniciální n = 32)
4. ACF TGR + EET-A (iniciální n = 32)
5. ACF TGR + ACEi (iniciální n = 32)
6. ACF TGR + EET-A + ACEi (iniciální n = 33)

Doba sledování byla 20 týdnů (den +140), ve dnech označených jako 0, +14, +28, +70 a +140 byla zvířata na 24 h umístěna do metabolických klecí, byla sbírána moč a měřena diuréza a albuminurie. Na konci sledovací doby bylo u přeživších potkanů provedeno echokardiografické vyšetření, invazivní P-V analýza LK a po ukončení experimentu byly zváženy orgány. Z každé kontrolní skupiny (100 % přežití) bylo náhodně vybráno 12 zvířat k těmto měřením.

### Výsledky

Všichni kontrolní (bez ACF) HanSD i TGR potkání přežili do konce experimentu. Neléčení ACF TGR začali umírat ve dne +3 (17 dní po vytvoření ACF) a ke dni +70 byli všichni mrtví. Terapeutické režimy významně zvýšili přežívání ACF TGR oproti neléčené skupině s procentuálním přežitím na konci experimentu 45,5 % (monoterapie EET-A), 59,4 % (monoterapie ACEi) a 71 % (kombinace EET-A a ACEi), rozdíly mezi terapeutickými skupinami nebyly významné (ACF TGR + EET-A vs. ACF TGR + ACEi,  $p = 0,25$ ; ACF TGR + EET-A vs. ACF TGR + EET-A + ACEi,  $p = 0,20$ ; ACF TGR + ACEi vs. ACF TGR + EET-A + ACEi,  $p = 0,83$ ; neléčení ACF TGR vs. všechny terapeutické skupiny,  $p < 0,05$ ; kontrolní TGR vs. všechny terapeutické skupiny,  $p < 0,05$ ) (graf 8).

Na začátku experimentu (den 0, tj. 2 týdny po ACF / sham proceduře) vykázali kontrolní TGR 20krát vyšší albuminurii než kontrolní HanSD potkání. Ve skupině ACF TGR byla albuminurie 2 týdny po vytvoření ACF 2,5krát nižší než u kontrolních TGR, což bylo pravděpodobně způsobeno iniciální renální hypoperfuzí krátce po vytvoření ACF a

následném poklesu krevního tlaku. Albuminurie u kontrolních HanSD potkanů postupně rostla v průběhu experimentu s věkem potkanů, nicméně na konci byla stále významně nižší než u kontrolních TGR na začátku ( $3,9 \pm 0,2$  vs.  $8,2 \pm 1,6$  mg/24 h,  $p < 0,05$ ). I u kontrolních TGR došlo k výrazné elevaci albuminurie v průběhu experimentu ( $45,1 \pm 4,1$  vs.  $8,2 \pm 1,6$  mg/24 h,  $p < 0,05$ ) (graf 9).

Všechny terapeutické režimy snížily albuminurii u ACF TGR, výrazněji při terapii s ACEi (monoterapie ACEi i kombinace ACEi s EET-A) oproti monoterapii EET-A, kdy byly hodnoty albuminurie na konci experimentu nižší než u kontrolních HanSD potkanů ( $0,14 \pm 0,02$  a  $0,13 \pm 0,02$  vs.  $3,9 \pm 0,2$  mg/24 h;  $p < 0,05$  pro oba režimy – ACEi i ACEi + EET-A) (graf 9).

Progresivní mírné zvyšování albuminurie s věkem u normotenzních potkanů (HanSD) je fyziologický jev stárnutí, u hypertenzních potkanů (TGR) je výrazněji rostoucí albuminurie uznávaným ukazatelem hypertenzního orgánového poškození (hypertenzní nefropatie) (Honetschlagerová *et al.* 2021).

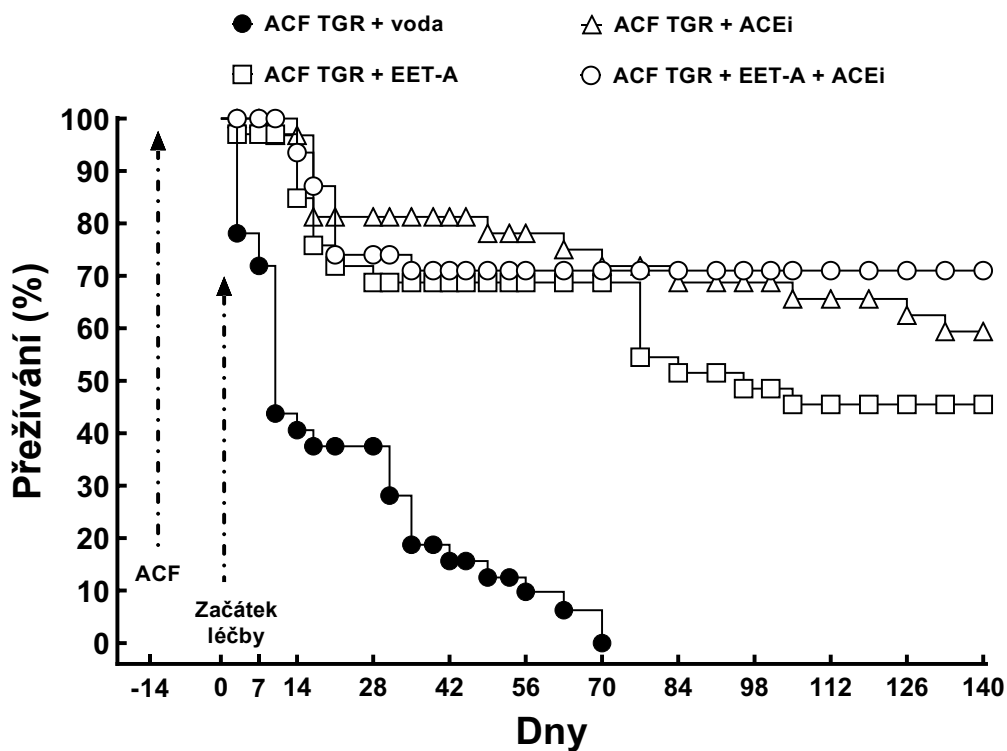
Tabulka 3 zobrazuje váhy orgánů přeživších potkanů na konci experimentu (po 20 týdnech terapie), vzhledem ke 100% mortalitě neléčených ACF TGR můžeme porovnávat pouze terapeutické skupiny mezi sebou a ev. s váhami v časném stádiu srdečního selhání (tj. série 2, po 2týdenní terapii). Stupeň bilaterální srdeční a LK hypertrofie na konci experimentu byl u obou monoterapií podobný jako u neléčené skupiny ACF TGR 4 týdny po ACF proceduře. Kombinovaná terapie ACEi s EET-A významně zmírnila rozvoj bilaterální srdeční hypertrofie a plicní kongesce oproti monoterapiím ACEi či EET-A.

Echokardiograficky byly na konci experimentu u všech terapeutických režimů zvětšeny systolický i diastolický rozměr LK oproti neléčené skupině ACF TGR 4 týdny po ACF proceduře. Zároveň došlo u všech skupin k podobně výraznému zhoršení funkce PK oproti časným fázím srdečního selhání (série 2), hodnoceno parametrem změny plochy PK (FAC) (tabulka 4).

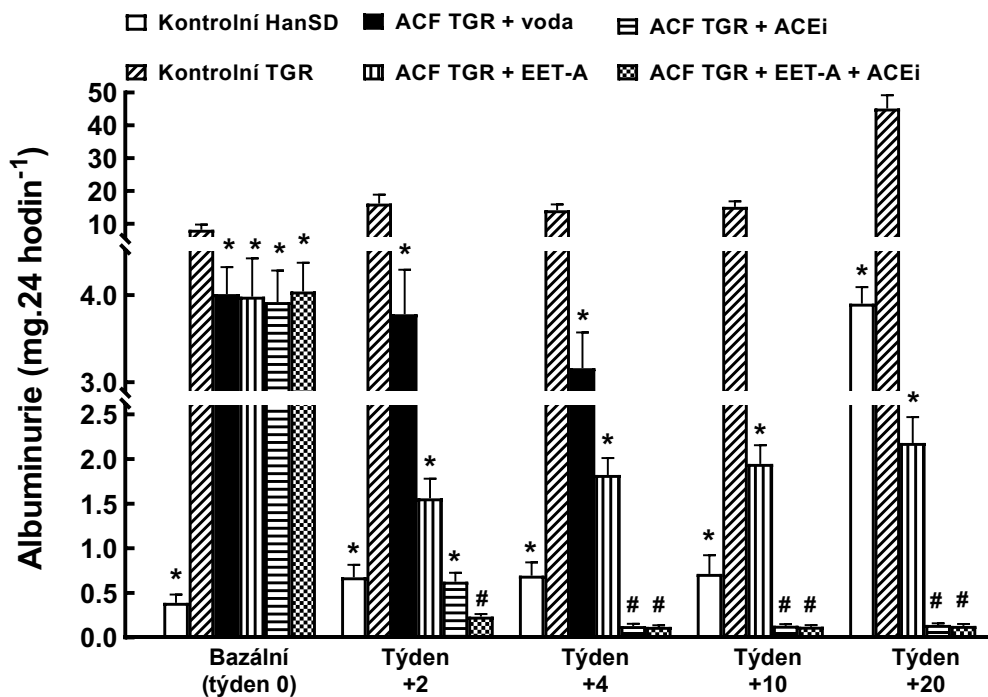
Invazivní P-V analýza LK u přeživších potkanů na konci experimentu ukázala zvýšený end-diastolický objem a tlak v LK u obou monoterapeutických režimů (graf 10 - C, E), který byl srovnatelný s hodnotami neléčených ACF TGR 4 týdny po ACF proceduře, avšak kombinovaná terapie ACEi s EET-A end-diastolický tlak v LK snížila na úroveň pozorovanou u kontrolní TGR skupiny, u end-diastolického objemu LK se jednalo o nesignifikantní trend k jeho zmenšení.

Všechny skupiny ACF TGR měli oproti TGR kontrolám na konci experimentu snížené systolické i diastolické hemodynamické parametry (ESPVR, EDPVR, PRSW, graf

11 - A, C, D). ACF TGR s monoterapiemi ACEi i EET-A měli vyšší napětí stěny LK (wall stress, graf 11 - E) v porovnání s kontrolními TGR, ale kombinovaná terapie ACEi s EET-A tento parametr významně snížila na úroveň srovnatelnou s kontrolními TGR.



Graf 8. Přžívací graf



Graf 9. Vývoj albuminurie u ACF TGR a vliv terapeutických režimů. \* vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$ . # vs. ACF TGR + EET-A,  $p < 0,05$

**Tabulka 3.** Tělesná váha a váhy orgánů 22 týdnů po ACF / sham proceduře, tj. 20 týdnů na terapii (voda / ACEi / EET-A / EET-A + ACEi)

	Skupina				
	HanSD	TGR	ACF TGR	ACF TGR	ACF TGR
	+ voda	+ voda	+ ACEi	+ EET-A	+ EET-A + ACEi
Tělesná váha (g)	630 ± 10	633 ± 9	689 ± 8 <sup>‡</sup>	701 ± 19	608 ± 18 <sup>®</sup>
Délka tibie (mm)	43.8 ± 0.2	43.7 ± 0.3	44.1 ± 0.4	44.2 ± 0.4	44.1 ± 0.4
Váha srdce (mg)/délka tibie (mm)	33.67 ± 0.58	46.69 ± 0.79 <sup>*</sup>	65.09 ± 1.12 <sup>‡</sup>	66.12 ± 1.22 <sup>‡</sup>	55.01 ± 1.09 <sup>®</sup>
Váha LK (mg)/délka tibie (mm)	26.94 ± 0.23	34.55 ± 0.89 <sup>*</sup>	39.22 ± 0.27 <sup>‡</sup>	40.27 ± 0.29 <sup>‡</sup>	33.33 ± 0.21 <sup>®</sup>
Váha PK (mg)/délka tibie (mm)	7.47 ± 0.21	7.57 ± 0.18	15.87 ± 0.35 <sup>‡</sup>	15.77 ± 0.33 <sup>‡</sup>	11.36 ± 0.22 <sup>®</sup>
Váha LK (mg)/PK (mg)	0.277 ± 0.03	0.219 ± 0.03	0.405 ± 0.04 <sup>‡</sup>	0.392 ± 0.03 <sup>‡</sup>	0.341 ± 0.03 <sup>®</sup>
Váha plic (mg)/délka tibie (mg)	49.77 ± 1.18	48.06 ± 1.23	61.91 ± 1.51 <sup>‡</sup>	66.97 ± 1.78 <sup>‡</sup>	51.29 ± 0.98 <sup>®</sup>
Váha ledviny (mg)/délka tibie (mg)	42.69 ± 0.99	42.56 ± 1.17	39.01 ± 1.23	40.27 ± 1.16	39.23 ± 1.25
Váha jater (mg)/délka tibie (mg)	458 ± 19	440 ± 23	444 ± 27	437 ± 25	447 ± 28

Hodnoty jsou průměry ± SEM, LK = levá komora, PK = pravá komora.

\* P <0,05 vs. kontrolní HanSD potkani; ‡ P <0,05 vs. TGR + voda; ® P <0,05 vs. ACF TGR + voda

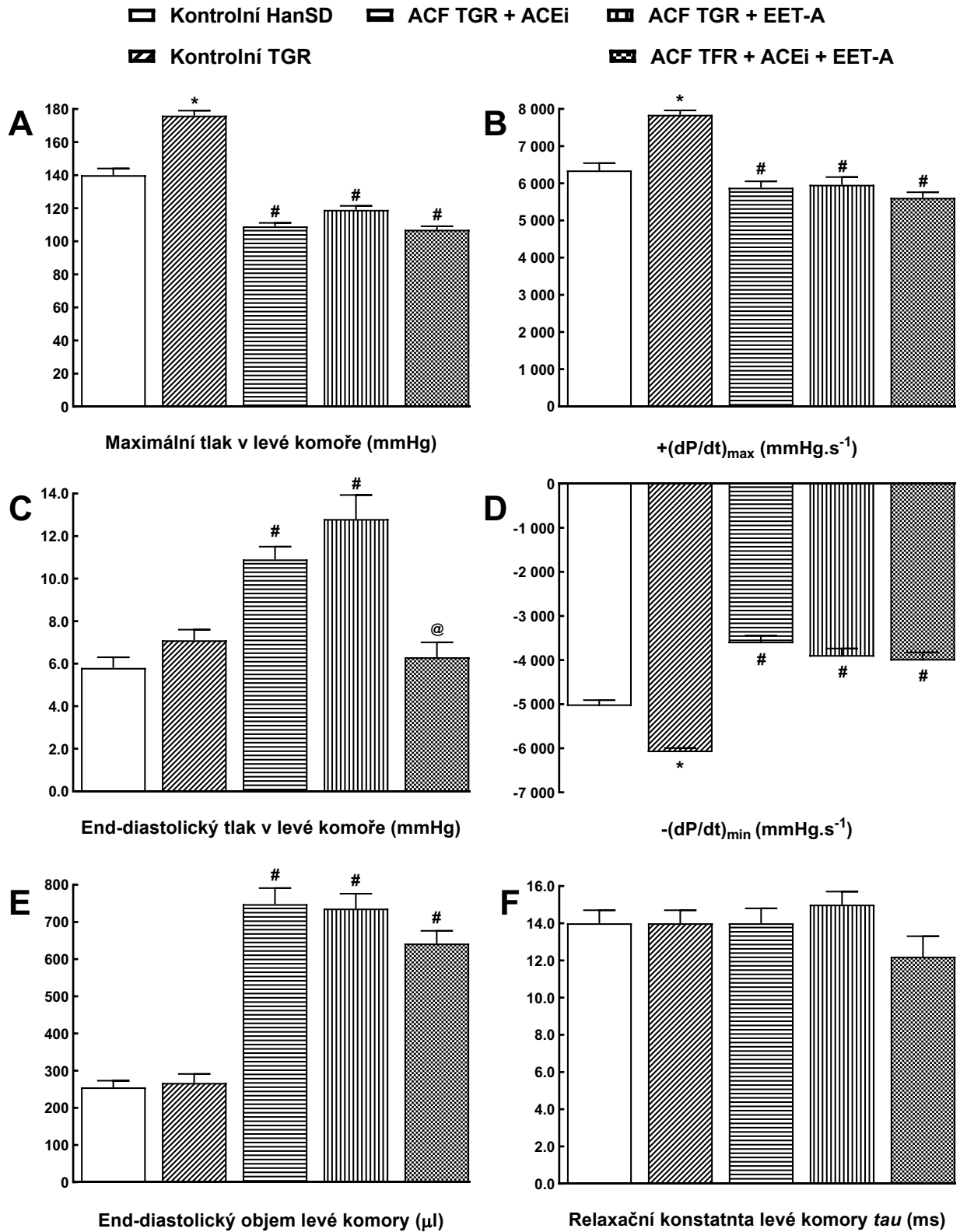
**Tabulka 4.** Echokardiografie 22 týdnů po ACF / sham proceduře, tj. 20 týdnů na terapii (voda / ACEi / EET-A / EET-A + ACEi)

	Skupina				
	HanSD	TGR	ACF TGR	ACF TGR	ACF TGR
	+ voda	+ voda	+ ACEi	+ EET-A	+ EET-A + ACEi
Tepová frekvence (min <sup>-1</sup> )	372 ± 9	365 ± 18	363 ± 9	365 ± 11	368 ± 19
Diastolický rozměr LK (mm)	6.96 ± 0.22	7.09 ± 0.27	11.29 ± 0.31 <sup>‡</sup>	11.12 ± 0.51 <sup>‡</sup>	11.51 ± 0.29 <sup>‡</sup>
Systolický rozměr LK (mm)	3.78 ± 0.22	4.35 ± 0.39	7.55 ± 0.26 <sup>*</sup>	7.63 ± 0.44 <sup>‡</sup>	7.69 ± 0.37 <sup>‡</sup>
Tloušťka přední stěny LK v diast. (mm)	2.32 ± 0.06	3.05 ± 0.06 <sup>*</sup>	2.06 ± 0.05 <sup>‡</sup>	2.25 ± 0.06 <sup>‡</sup>	1.87 ± 0.05 <sup>‡</sup>
Tloušťka zadní stěny LK v diast. (mm)	2.55 ± 0.06	3.07 ± 0.11 <sup>*</sup>	2.08 ± 0.05 <sup>‡</sup>	2.12 ± 0.07 <sup>‡</sup>	2.02 ± 0.05 <sup>‡</sup>
RWT LK	0.738 ± 0.04	0.913 ± 0.04 <sup>*</sup>	0.368 ± 0.02 <sup>‡</sup>	0.393 ± 0.02 <sup>‡</sup>	0.369 ± 0.03 <sup>‡</sup>
Ejekční frakce LK (%)	75.8 ± 1.9	71.6 ± 2.6	55.8 ± 1.6 <sup>*</sup>	53.9 ± 1.4 <sup>‡</sup>	57.3 ± 1.5 <sup>‡</sup>
Frakční zkrácení LK (%)	46.1 ± 1.7	44.6 ± 1.6	33.3 ± 0.7 <sup>*</sup>	32.5 ± 1.1 <sup>‡</sup>	32.4 ± 0.8 <sup>‡</sup>
Systolický objem LK (μl)	191 ± 11	174 ± 8	437 ± 22 <sup>‡</sup>	408 ± 29 <sup>‡</sup>	414 ± 31 <sup>‡</sup>
Srdeční výdej (ml/min)	69.9 ± 1.5	63.6 ± 4.2	158 ± 6.2 <sup>*</sup>	152 ± 10.1 <sup>‡</sup>	155 ± 8.7 <sup>‡</sup>
RVD1 (mm)	3.06 ± 0.13	3.08 ± 0.11	6.65 ± 0.19 <sup>‡</sup>	5.81 ± 0.36 <sup>‡</sup>	5.41 ± 0.13 <sup>®</sup>
RVD2 (mm)	2.45 ± 0.11	2.49 ± 0.12	6.03 ± 0.16 <sup>‡</sup>	5.28 ± 0.21 <sup>‡</sup>	5.02 ± 0.12 <sup>®</sup>
Frakční změna plochy PK (FAC) (%)	61.9 ± 5.8	65.1 ± 5.2	35.9 ± 1.1 <sup>*</sup>	39.5 ± 1.6 <sup>‡</sup>	33.7 ± 1.4 <sup>‡</sup>

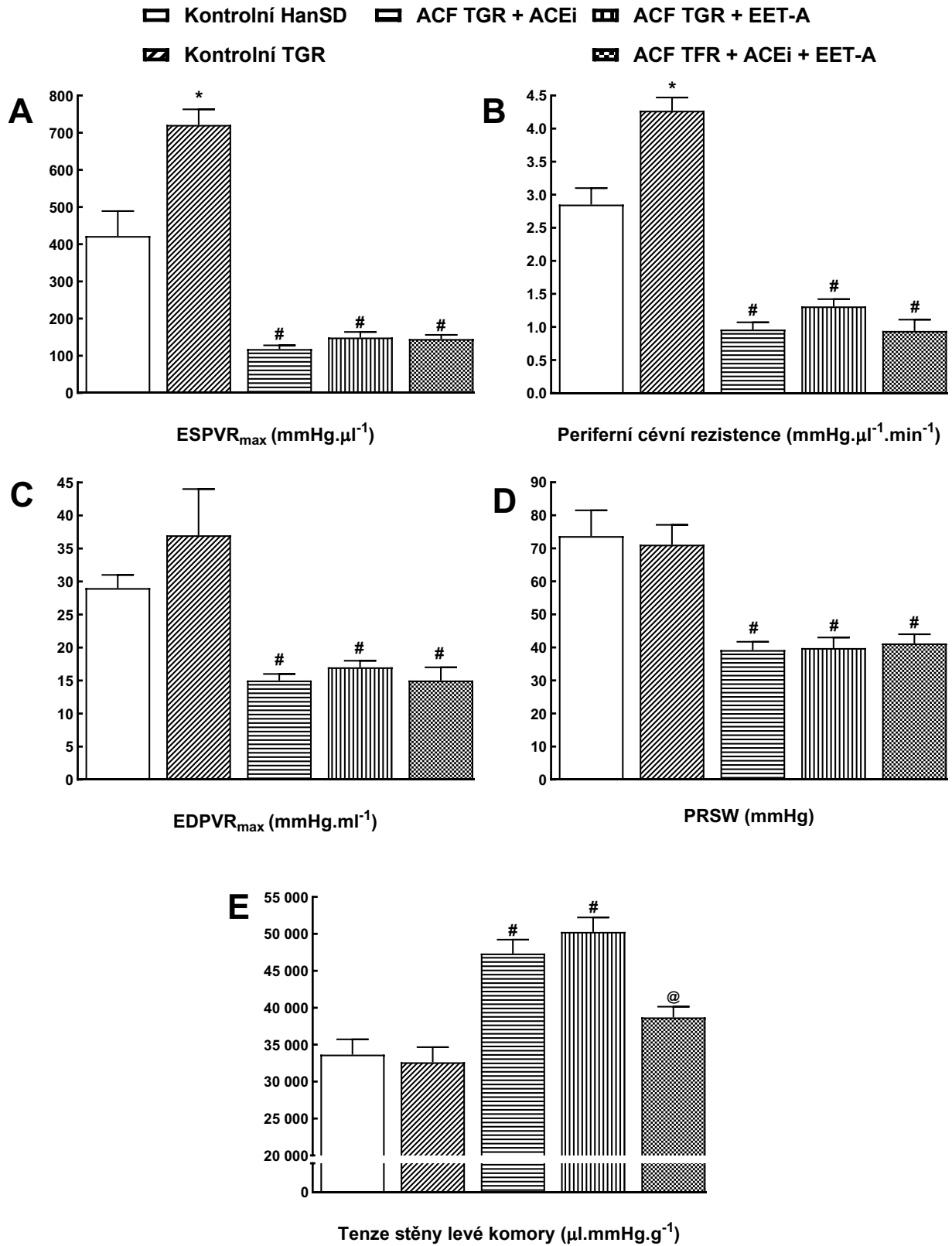
Hodnoty jsou průměry ± SEM, LK = levá komora, PK = pravá komora, RWT = relative wall thickness (relativní tloušťka stěny), RVD1 = diastolický rozměr PK u baze, RVD2 (diastolický rozměr PK v polovině komory).

\* P <0,05 vs. sham-operated HanSD rats; ‡ P <0,05 vs. TGR + water; ® P <0,05 vs. ACF TGR + ACEi





Graf 10. Tlakově-objemová analýza levé komory 22 týdnů po ACF / sham proceduře, tj. 20 týdnů na terapii (část A). \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$ . @ vs. ACF TGR + ACEi,  $p < 0,05$



Graf 11. Tlakově-objemová analýza levé komory 22 týdnů po ACF / sham proceduře, tj. 20 týdnů na terapii (část B). \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$ . @ vs. ACF TGR + ACEi,  $p < 0,05$

## 5.5. Diskuze

### 5.5.1. Aktivita neurohumorálních systémů u srdečního selhání navozeného ACF

Aktivita vazoaktivních / neurohumorálních systémů byla hodnocena v časné fázi srdečního selhání navozeného ACF (2 týdny po ACF proceduře, v době těsně před zahájením terapeutických režimů v dalších sériích). Naše data naznačují, že ACF u tohoto modelu ANG II-dependentní hypertenze vede k časnější aktivaci intrarenální a systémové vazodilatační / natriuretické osy RAAS (dle koncentrací ANG 1-7 a poměru ANG 1-7 / ANG II) oproti té vazokonstrikční / sodíkoretenční, která se dle neurohumorální hypotézy podílí na dlouhodobé progresi srdečního selhání. Naše výsledky jsou v souladu se zjištěním, že zvýšený poměr ANG 1-7 / ANG II predikuje kompenzovanou fázi CHSS s příznivější prognózou (Wang *et al.* 2020). Nezjistili jsme významný rozdíl v plazmatické či intrarenální koncentraci NA, což naznačuje, že 2 týdny po vytvoření ACF ještě nedochází k výrazné systémové či intrarenální aktivaci SNS (Díaz *et al.* 2020; Dube & Weber 2011; Hartupee & Mann 2016; Packer 1992; Packer & McMurray 2017). Souhrnně se tedy v tuto dobu jedná o časnou fázi kompenzovaného srdečního selhání bez hyperaktivace dlouhodobě maladaptivních neurohumorálních systémů.

Při zaměření na další vazoaktivní systémy jsme zjistili sníženou tkáňovou dostupnost biologicky aktivních EETs v ledvině a v myokardu LK u ACF TGR, což nebylo dáno jejich sníženou produkcí (dle proteinové exprese CYP2C23 a CYP2J3), ale spíše zvýšenou degradací na biologicky méně aktivní DHETs, navíc jsme v ledvině i v myokardu LK detekovali zvýšenou proteinovou expresi sEH, enzymu, který se podílí na metabolizování EETs na DHETs. To podpořilo naši hypotézu a zkoumání terapeutických režimů s EET analogem a inhibítorem sEH (viz. níže). Naopak naše další zjištění, že u ACF TGR není v časných fázích zvýšená tkáňová proteinová exprese CYP4A1 ani koncentrace 20-HETE nepodporuje hypotézu maladaptivních účinků této CYP-450-dependentní  $\omega$ -hydroxylázové cesty metabolismu AA na progresi chronického srdečního selhání (Alsaad *et al.* 2013; Rocic & Schwartzman 2018). Je ale možné, že k její aktivaci dochází v pozdějších fázích nebo při dekompenzaci chronického srdečního selhání, což jsme ale v naší studii nezkoumali.

### 5.5.2. Vliv terapeutických režimů na přežívání

Prokázali jsme výrazně příznivý vliv monoterapií EET-A i ACEi na snížení mortality u ACF TGR. To podporuje naši výše zmíněnou hypotézu negativního vlivu snížené tkáňové dostupnosti biologicky aktivních EETs u CHSS a naznačuje, že farmakologické postupy na zvrácení tohoto jevu by mohly být budoucími novými terapeutickými směry v léčbě CHSS. Terapie tlumící hyperaktivovanou vazokonstrikční / natrium retenční osu RAAS (ACEi) je delší dobu zavedeným zlatým standardem farmakoterapie CHSS, což bylo podpořeno mnoha klinickými randomizovanými studiemi, kde terapie ACEi zlepšila průběh i prognózu pacientů s CHSS (McDonagh *et al.* 2021), a byla také ověřena na modelu ACF TGR (Červenka *et al.* 2015b). V pokročilých fázích onemocnění však i tato terapie naráží na své limity zejména ve smyslu antihypertenzního efektu, a tudíž nemožnosti použití u pacientů se sklonem k hypotenzi. Proto je intenzivní snaha vyvinout nové terapeutické možnosti ovlivňující jiné metabolické dráhy bez výrazných nežádoucích účinků (vč. antihypertenzních) do kombinací se zavedenými léky.

Naše výsledky demonstrují zlepšení přežívání u modelu ACF TGR s oběma monoterapiemi, i když každá působí přes jiný humorální systém, což indukuje hypotézu, že by kombinovaná terapie pomocí EET-A a ACEi mohla zlepšit přežívání nad rámec monoterapií. Toto však v naší studii nebylo potvrzeno. I když procento přežití na konci experimentu bylo u kombinované terapie numericky vyšší než u monoterapií, nedosáhlo statistické signifikance. Experiment byl ukončen podle protokolu po 20 týdnech terapie, bohužel nevíme, zda by se příznivý efekt kombinované terapie neprojevil později. Tuto úvahu podporují výsledky echokardiografie a váhy orgánů u přeživších potkanů na konci experimentu, kde byl pozorován příznivý efekt kombinované terapie na celkovou srdeční i samostatnou PK a LK hypertrofii a na plicní kongesci oproti monoterapiím. Navíc, invazivní P-V analýza LK u těchto přeživších potkanů prokázala u kombinované terapie snížení end-diastolického tlaku v LK a snížení napětí stěny LK (wall stress) oproti monoterapiím.

### 5.5.3. Mechanizmy příznivého terapeutického účinku

Z našich předchozích prací víme, že u ACF TGR začíná od 3. týdne po vytvoření ACF docházet k umírání potkanů, po 5. týdnu žije kolem 50% a po 10. týdnu téměř žádný jedinec, proto jsme načasovali zahájení farmakoterapie do časně kompenzované fáze CHSS, než začne docházet k jeho dekompenzacím a akceleraci mortality (Červenka *et al.*

2015b; Honetschlagerová *et al.* 2021; Kratky *et al.* 2021). Nejvýraznější redukci mortality oproti neléčené skupině jsme u terapeutických režimů pozorovali kolem 4. týdne po vytvoření ACF (tj. 2 týdny na léčbě), kdy neléčených ACF TGR přeživalo pouze 41 %, oproti terapeutickým skupinám (85 %, 97 % a 94 %). Proto jsme v sériích 2 a 3 provedli v tuto dobu (2 týdny na léčbě, tj. 4 týdny od ACF / sham procedury) experimenty k ozřejmění příznivého terapeutického efektu na přežívání přes zlepšení srdečních nebo renálních funkcí, neboť renální insuficience je významná komorbidita u srdečního selhání ovlivňující dlouhodobou prognózu (viz. výše).

Neléčení ACF TGR měli v době renálního pokusu (4 týdny od ACF procedury) již rozvinuté poškození renální hemodynamiky a vylučovacích funkcí, avšak překvapivě jsme nepozorovali významné zlepšení na žádném z terapeutických režimů. Renální mechanismy tedy pravděpodobně nejsou dominantně zodpovědné za příznivý efekt léčby na přežívání.

Vytvoření ACF vedlo po 4 týdnech k výrazné excentrické remodelaci a hypertrofii LK z důvodu zvýšeného srdečního výdeje (část srdečního výdeje se zkratuje přes ACF). Pomocí echokardiografie a P-V analýzy LK jsme prokázali snížení systolické  $(+dP/dt)_{max}$ , ESPVR, PRSW, ejekční frakce LK a frakční zkrácení LK) i diastolické  $(-dP/dt)_{max}$  a relaxační konstanta LK) funkce LK již v časných fázích srdečního selhání (4 týdny po ACF proceduře). Neléčení ACF TGR měli v tuto dobu i zvýšený end-diastolický tlak a objem LK doprovázený vyšší vahou plic, ale nikoliv jater, což poukazuje na rozvoj zejména levostranného srdečního selhání, prozatím bez známek selhávání PK. Všechny tři terapeutické režimy zmírnily zvýšení end-diastolického objemu, tlaku i relaxační konstanty tau LK, ale další systolické a diastolické parametry nebyly statisticky významně ovlivněny. Monoterapie ACEi a jeho kombinace s EET-A navíc výrazně snížila plicní kongesci (u monoterapie EET-A pouze statisticky nevýznamný trend). Tato terapeutická zlepšení po 2 týdnech léčby se podílela na zmírnění mortality ACF TGR na srdeční selhání. Bohužel naše echokardiografická data a P-V analýza LK u přeživších potkanů na konci přeživací série neprokázaly úplnou protekci před postupným rozvojem bilaterálního srdečního selhání se žádným z našich terapeutických režimů.

Přesné mechanismy příznivého ovlivnění end-diastolického objemu, tlaku a izovolumické relaxace LK s následnou sníženou plicní kongescí v kritické fázi srdečního selhání u ACF TGR nejsou do detailu objasněny, ačkoliv víme, že tento efekt kombinované terapie ACEi s EET-A není dán snížením afterloadu, protože nedošlo ke snížení celkové periferní rezistence (TPR), jak po 2 týdnech léčby, tak na konci přeživací série. Proto bychom rádi v budoucnu studovali tyto příznivé terapeutické efekty na

buněčné a subcelulární úrovni např. analýzou exprese messenger RNA (mRNA) v myokardu LK.

## **6. Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEHi)**

Vzhledem ke zjištění snížené srdeční a renální tkáňové dostupnosti aktivních EETs a vyšší proteinové expresi sEH u ACF TGR je další možností zvrácení tohoto deficitu inhibice degradace EETs na neaktivní DHETs. K tomu byl v našich studiích použit inhibitor sEH (sEHi): cAUCB (cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)cyclohexyloxy] benzoová kyselina, viz. výše).

### **6.1. Vliv kombinované léčby sEHi s ACEi na přežívání a renální funkce u potkaního CHSS**

V naší nedávné práci jsme potvrdili příznivý vliv monoterapie sEHi na rozvoj renální insuficience a přežívání u ACF TGR. Neléčení ACF TGR měli přežívání po 50týdenním sledování pouze 14 %, monoterapie sEHi ho významně zvýšila na 41 % (Červenka *et al.* 2015b). Vzhledem k unikátnímu mechanismu účinku sEHi oproti zavedené farmakoterapii CHSS jsme v tomto projektu zkoumali aditivní efekt sEHi v kombinaci s ACEi.

#### **6.1.1. Série 1: Vliv kombinované léčby ACEi a sEHi na přežívání ACF TGR potkanů**

Potkani podstoupili ACF / sham proceduru v týdnu -1 (viz. metodika), v týdnu 0 byli rozděleni do terapeutických skupin:

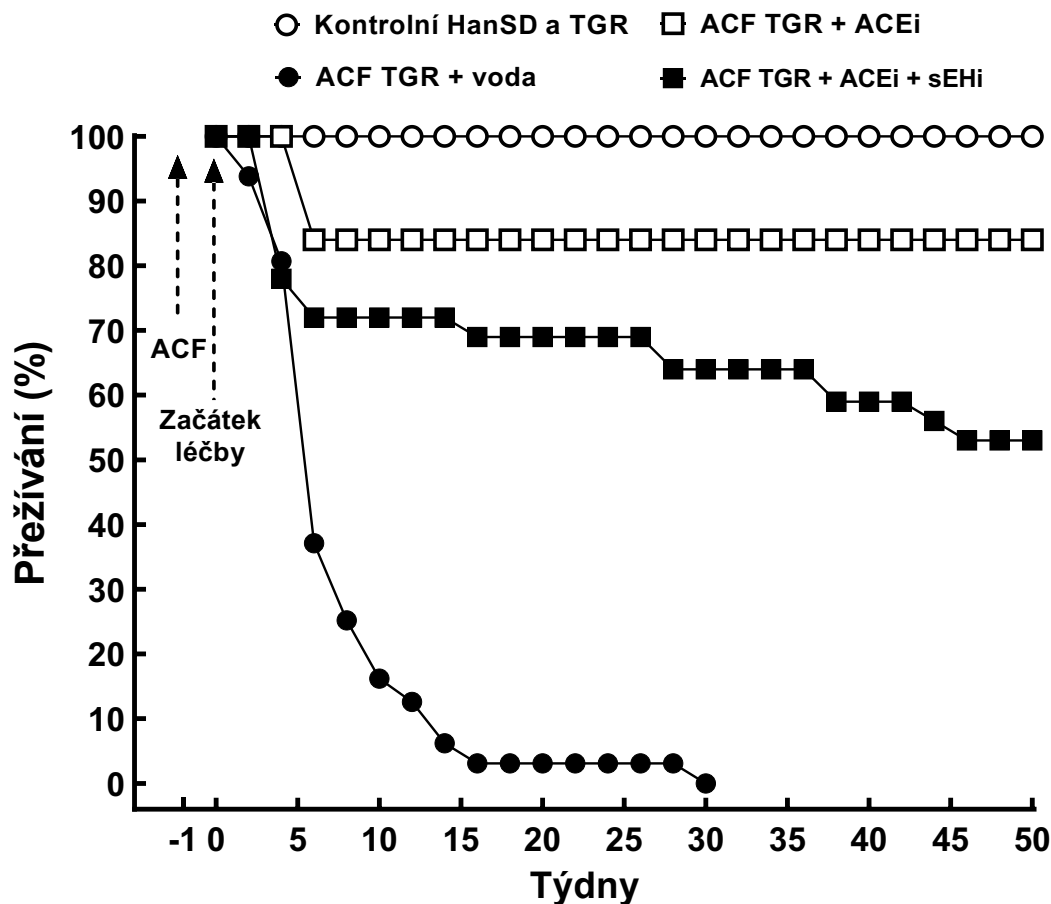
1. Kontrolní HanSD potkani + placebo (voda) (počáteční n=7)
2. Kontrolní TGR + placebo (počáteční n=9)
3. ACF TGR + placebo (počáteční n=32)
4. ACF TGR + ACEi (počáteční n=32)
5. ACF TGR + ACEi + sEHi (počáteční n=36)

Doba sledování byla 50 týdnů.

#### **Výsledky**

Všichni HanSD i TGR potkani po sham proceduře přežili do konce experimentu. Neléčení ACF TGR začali významněji umírat 3 týdny po ACF a po 29. týdnu již nežil žádný. Monoterapie ACEi zvýšila přežívání na konečných 84 % ( $p < 0,05$  oproti neléčeným ACF TGR). Kombinovaná léčba sEHi a ACEi zlepšila přežívání na 53 % oproti neléčeným

ACF TGR ( $p < 0,05$ ), avšak oproti monoterapii ACEi byla významně horší ( $p < 0,05$ ) (graf 12).



Graf 12. Přeživací graf

### 6.1.2. Série 2: Vliv dvoutýdenní kombinované léčby ACEi a sEHi na váhu orgánů, krevní tlak a na renální hemodynamiku a exkreční funkce u ACF TGR

Zvířata byla připravena jako v předchozí sérii (ACF / sham procedura v týdnu -1), v týdnu 0 byli potkani rozděleni do terapeutických skupin a byla zahájena léčba. Po dvou týdnech léčby byly provedeny renální clearancové pokusy ke zhodnocení renální hemodynamiky a exkrečních funkcí (viz. výše).

Studovány byly stejné skupiny jako v sérii 1:

1. Kontrolní HanSD potkani + placebo (voda) (počáteční n=12)
2. Kontrolní TGR + placebo (počáteční n=10)
3. ACF TGR + placebo (počáteční n=11)
4. ACF TGR + ACEi (počáteční n=10)

## 5. ACF TGR + ACEi + sEH<sub>i</sub> (počáteční n=10)

### Výsledky

Kontrolní TGR měli výraznou srdeční (zejména levokomorovou) hypertrofii (vyjádřenou poměrem váhy LK k délce tibie, graf 13 - A, B) v porovnání s kontrolními HanSD potkany ( $p < 0,05$ ). U neléčených ACF TGR došlo k další progresi hypertrofie oproti kontrolním TGR ( $p < 0,05$ ). Monoterapie ACEi a také jeho kombinace se sEH<sub>i</sub> významně snížila celkovou srdeční i LK hypertrofii až k hodnotám srovnatelným s kontrolními TGR.

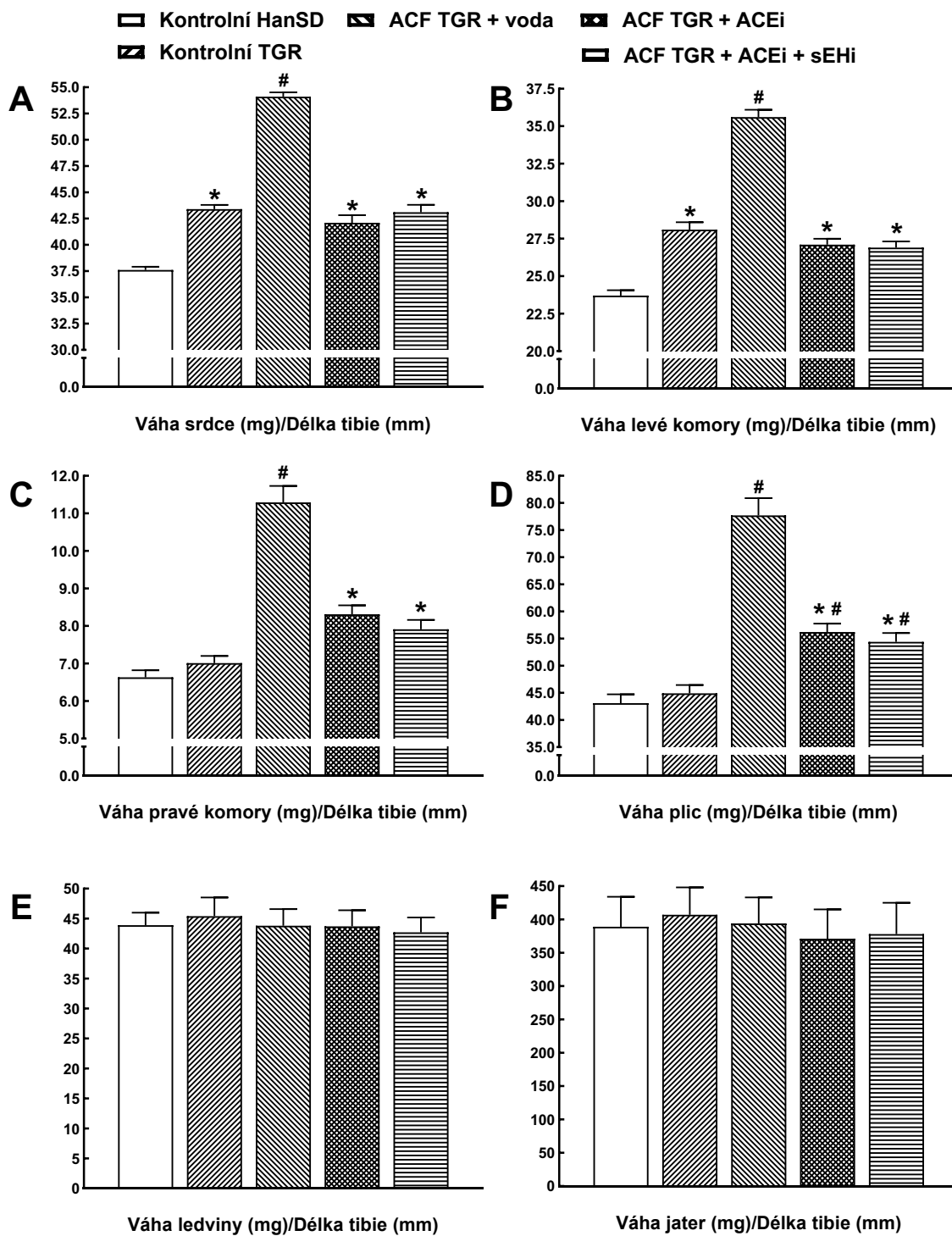
U váhy PK nebyl pozorován rozdíl mezi kontrolními TGR a HanSD potkany, neléčení ACF TGR však měli váhu PK významně zvýšenou oproti kontrolním TGR ( $p < 0,05$ ), což ukazuje na rozvoj i pravostranné srdeční hypertrofie. Oba terapeutické režimy významně snížily hypertrofii PK na podobnou úroveň (graf 13 - C).

Neléčení ACF TGR měli vyšší váhu plic oproti kontrolním TGR i HanSD, což značí rozvoj plicní kongesce u ACF TGR ( $p < 0,05$ ). Obě léčby ji významně zmírnily, ovšem stále nad úroveň kontrolních TGR ( $p < 0,05$ ) (graf 13 - D). Nebyl pozorován rozdíl u váhy jater a ledvin mezi skupinami (graf 13 - E, F).

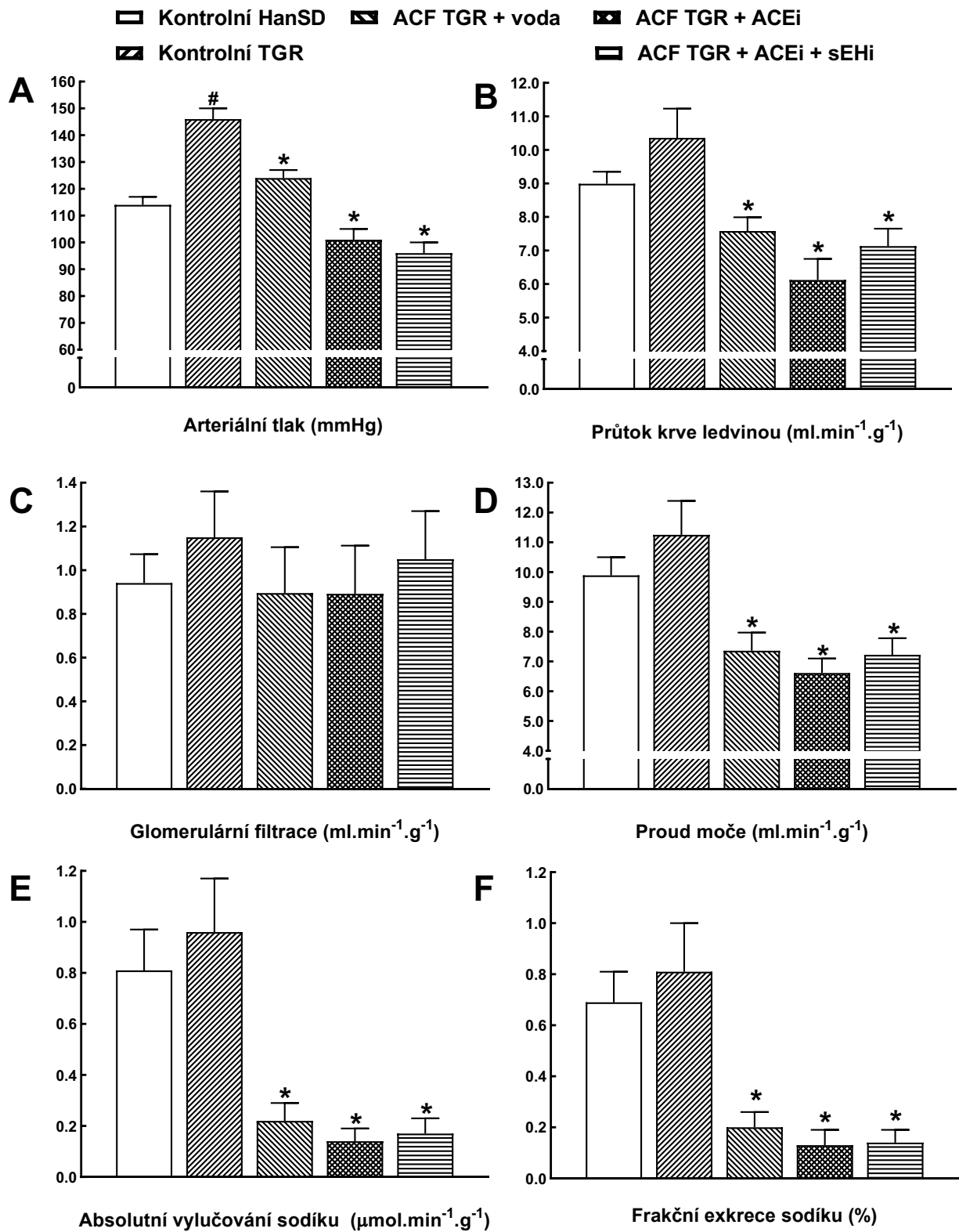
Kontrolní TGR byli výrazně hypertenzní oproti kontrolním HanSD ( $p < 0,05$ ). Neléčení ACF TGR měli nižší arteriální tlak (TK) než kontrolní TGR, ale stále zůstal vyšší než u kontrolních HanSD ( $p < 0,05$ ). Terapeutické režimy srovnatelně snížily TK u ACF TGR v porovnání s neléčenými ACF TGR na úroveň dokonce nižší než kontrolní HanSD ( $p < 0,05$ ) (graf 14 - A).

Nebyl pozorován rozdíl v PKL u kontrolních TGR a HanSD, neléčení ACF TGR měli ale výrazně nižší PKL ( $p < 0,05$ ) (graf 14 - B), GFR se mezi skupinami výrazně nelišila (graf 14 - C). Neléčení ACF TGR měli dále nižší diurézu a absolutní i frakční exkreci sodíku v porovnání s kontrolními HanSD i TGR ( $p < 0,05$ ) (graf 14 - D, E, F). Monoterapie ACEi a ani kombinovaná léčba ACEi se sEH<sub>i</sub> významně nezvrátily pokles PKL, ani nenormalizovala žádný z parametrů sodíkové exkrece (graf 14).





Graf 13. Váhy orgánů vztažené na délku tibiae 3 týdny po ACF, tj. 2 týdny na terapii. \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$



Graf 14. Střední arteriální tlak, průtok krve ledvinou a renální funkce 3 týdny po ACF, tj. 2 týdny na terapii. \* vs. kontrolní HanSD,  $p < 0,05$ . # vs. kontrolní TGR,  $p < 0,05$

### 6.1.3. Diskuze

Hlavním zjištěním této studie je, že přidání sEHi k zavedené terapii ACEi nezlepšilo přežívání a ani neovlivnilo rozvoj renální dysfunkce u ACF TGR, kombinovaná léčba měla naopak horší přežívání než monoterapie ACEi.

Již tři týdny po ACF byly u TGR měřitelné známky bilaterální srdeční hypertrofie s levostranným srdečním selháním (plicní kongescí), ale zatím bez pravostranného srdečního selhání (bez jaterní kongesce). Navíc bylo v tuto dobu už patrné i poškození renální hemodynamiky a renální sodíkové exkrece. Po této době byl v přeživací sérii pozorován nárůst mortality u neléčené skupiny, což podporuje klinická data, kdy je rozvoj renální dysfunkce u pacientů s CHSS asociován s horší prognózou (Braam *et al.* 2014; Costanzo 2020; Fan *et al.* 2015; Rangaswami *et al.* 2019; Re 2017).

Neočekávaným zjištěním bylo zhoršení přežívání na kombinované léčbě ACEi a sEHi oproti monoterapii ACEi, pro což nemáme jasné vysvětlení, pouze pracovní hypotézu. Bylo prokázáno, že jak zavedená antihypertenzní léčba ACEi (přes intrarenální blokádu RAAS (Gonzalez-Villalobos *et al.* 2013; Kobori *et al.* 2007), tak i sEHi (zvýšení intrarenálních EETs a vazodilatační a natriuretický efekt (Elmarakby 2012; Fleming 2014; Imig *et al.* 2021)) působí snížení krevního tlaku. Proto by kombinovaná léčba, navíc při progresivní renální dysfunkci, a tím pádem snižování eliminace léčiv, mohla v dlouhodobém působení vést k poklesu krevního tlaku pod úroveň renálních autoregulačních schopností (Carlström *et al.* 2015). To by mohlo vést k dalšímu zhoršování renálních funkcí a zvýšení mortality ACF TGR na této kombinované léčbě. Avšak naše data z tohoto experimentu ukázala, že se arteriální tlak třetí týden po ACF významně nelišil u kombinované léčby ( $96 \pm 3$  mmHg) a monoterapie ACEi ( $101 \pm 3$  mmHg,  $p > 0,05$ ). V obou případech zůstával arteriální tlak v mezích renální autoregulace. Bohužel jsme ale neprováděli hodnocení delšího vlivu léčby na krevní tlak, což by vyžadovalo dlouhodobé telemetrické monitorování u neanestezovaných zvířat.

Vzhledem k příznivému neovlivnění renální dysfunkce u ACF TGR je alternativní hypotéza příčiny zlepšení přežívání kombinovanou terapií oproti neléčené skupině možné snížení afterloadu (snížení arteriálního tlaku), a tím pádem nižší plicní kongesce u ACF TGR (Abassi *et al.* 2011; Braunwald 2015; Oliver-Dussault *et al.* 2010), což v našich datech bylo naznačeno nižší vahou plic u všech léčebných režimů oproti neléčeným ACF TGR.

Limitací této práce je, že jsme specificky nehodnotili srdeční funkce, echokardiograficky ani P-V analýzou LK, jako v předchozím projektu s EET-A, kde jsme

ukázali rozvoj systolické a diastolické dysfunkce u modelu ACF TGR. Tato měření byla provedena již dříve v naší předchozí práci (Červenka *et al.* 2015b), ve které jsme neprokázali benefit 5týdenní monoterapie ACEi ani sEHi (nehodnotila se kombinovaná léčba) na systolické i diastolické srdeční funkce u ACF TGR, a proto jsme se domnívali, že příznivý vliv na přežívání bude způsoben přes ovlivnění renální dysfunkce u tohoto modelu. To se ovšem u naší aktuální práce nepodařilo prokázat.

## **6.2. Pohlavní rozdíly v mortalitě TGR po vytvoření ACF: efekt monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi a sEHi**

Mužské pohlaví je všeobecně považováno za rizikovější pro kardiovaskulární onemocnění včetně CHSS, často ale dochází k podhodnocování rizika u žen a k jejich nízkému zastoupení ve velkých klinických studiích (Cook *et al.* 2015; Eisenberg *et al.* 2018; Reynolds *et al.* 2022; Westerman & Wenger 2016). Nedávné práce ovšem toto paradigma narušily analýzou kohorty pacientů se srdečním selháním a redukovanou ejekční frakcí LK, kde prokázali, že ženy měly vyšší mortalitu (Westerman & Wenger 2016) a horší kvalitu života než muži (Eisenberg *et al.* 2018; Hsich & Piña 2009; Lewis *et al.* 2007; Reynolds *et al.* 2022). Ačkoliv incidence a prevalence pacientů s CHSS je vyšší u mužů, absolutní číslo pacientů s CHSS je u obou pohlaví srovnatelné kvůli celkovému vyššímu dožití žen (Eisenberg *et al.* 2018; Westerman & Wenger 2016). Z celkového počtu ročních úmrtí na CHSS je 60 % žen (Boliijn *et al.* 2017; Eisenberg *et al.* 2018; Westerman & Wenger 2016). Navíc riziko rozvoje CHSS po infarktu myokardu je vyšší u žen (Lam *et al.* 2015). Proto je potřeba zkoumat patofyziologické mechanismy těchto pohlavních rozdílů a účinků nových farmakologických cílů u CHSS (Boliijn *et al.* 2017; Eisenberg *et al.* 2018; Regitz-Zagrosek & Kararigas 2017; Reynolds *et al.* 2022). Ve většině preklinických projektech se z různých praktických důvodů (např. samičí ovariální cyklus) využívají výhradně samci, což ale výrazně limituje obecnou interpretaci získaných dat (Arnold *et al.* 2017; Blenck *et al.* 2016; Miller *et al.* 2017; Regitz-Zagrosek & Kararigas 2017). U objemového modelu CHSS navozeném ACF byly doposud publikovány pohlavní rozdíly v mortalitě a srdeční remodelaci bez studování rozdílných odpovědí na léčbu (Červenka *et al.* 2016; Dent *et al.* 2010; Gardner *et al.* 2005; Lu *et al.* 2012). V naší předchozí práci jsme ukázali, že hypertenzní TGR potkání vykazují významné pohlavní rozdíly v mortalitě po vytvoření ACF (Červenka *et al.* 2016). Navíc u samčích ACF TGR je snížena tkáňová dostupnost EETs, její zvýšení pomocí blokády sEH zmírnilo u samců mortalitu oproti neléčeným ACF TGR (Červenka *et al.* 2015b), ale v

kombinaci s ACEi nevedlo k aditivnímu příznivému efektu a mortalita byla dokonce vyšší než u monoterapie ACEi (viz. předchozí práce, Kala et al. 2018). Protože dosavadní preklinické práce zkoumající farmakologické ovlivnění CYP-dependentního metabolismu AA byly prováděny výhradně na samcích, zaměřili jsme se v tomto projektu na možné pohlavní rozdíly v odpovědi na terapii sEHi u modelu ACF TGR.

### **6.2.1. Vliv monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi a sEHi na přežívání HanSD i TGR samic a samců po vytvoření ACF**

Cílem bylo zjistit, zda existují pohlavní rozdíly v přežívání ACF TGR léčených monoterapií ACEi a na kombinované léčbě ACEi a sEHi. Potkanům byla provedena ACF / sham procedura v týdnu -1, po 1 týdnu byli rozděleni do léčebných skupin a byla zahájena terapie (týden 0):

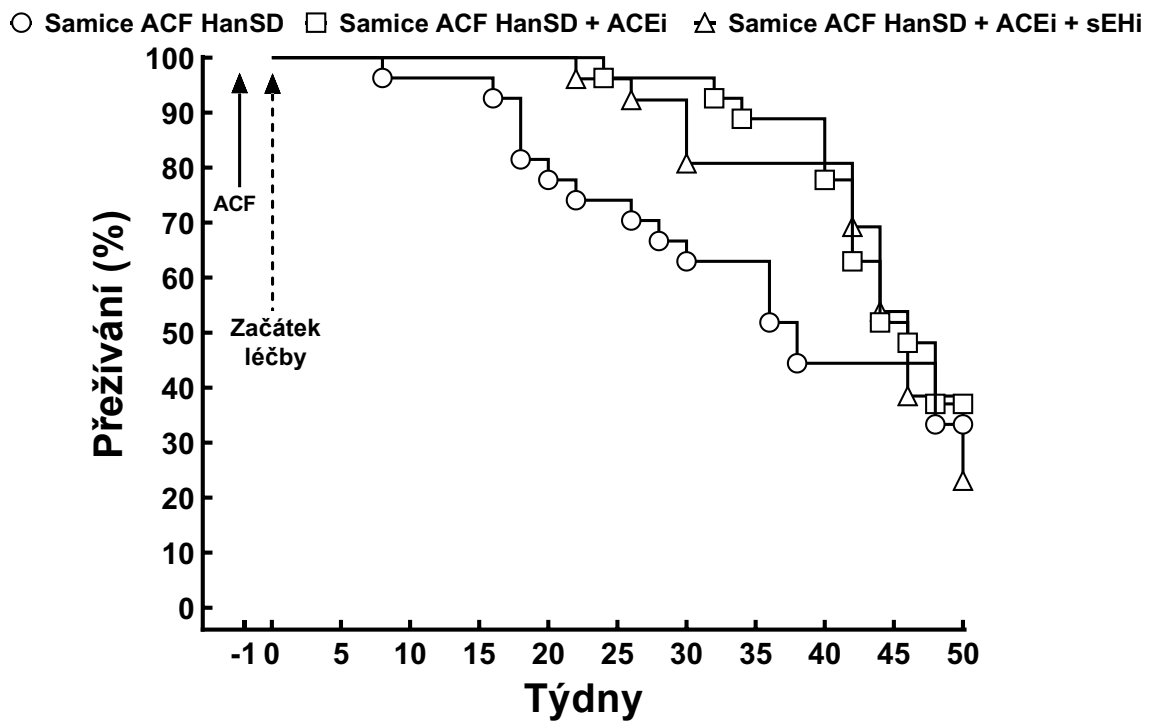
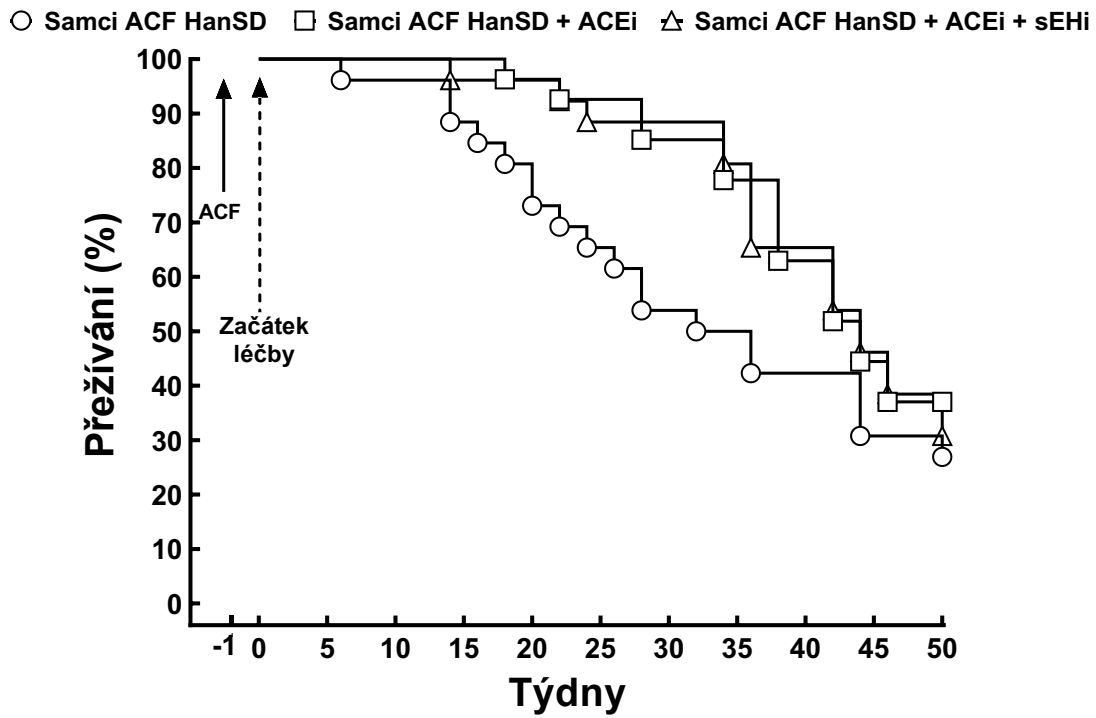
1. Kontrolní samci HanSD + placebo (iniciální n=9)
2. Samci ACF HanSD + placebo (iniciální n=26)
3. Samci ACF HanSD + ACEi (iniciální n=27)
4. Samci ACF HanSD + ACEi + sEHi (iniciální n=26)
5. Kontrolní samice HanSD + placebo (iniciální n=9)
6. Samice ACF HanSD + placebo (iniciální n=27)
7. Samice ACF HanSD + ACEi (iniciální n=27)
8. Samice ACF HanSD + ACEi + sEHi (iniciální n=26)
9. Kontrolní samci TGR + placebo (iniciální n=9)
10. Samci ACF TGR + placebo (iniciální n=33)
11. Samci ACF TGR + ACEi (iniciální n=34)
12. Samci ACF TGR + ACEi + sEHi (iniciální n=37)
13. Kontrolní samice TGR + placebo (iniciální n=10)
14. Samice ACF TGR + placebo (iniciální n=37)
15. Samice ACF TGR + ACEi (iniciální n=34)
16. Samice ACF TGR + ACEi + sEHi (iniciální n=36)

Doba sledování byla 50 týdnů.

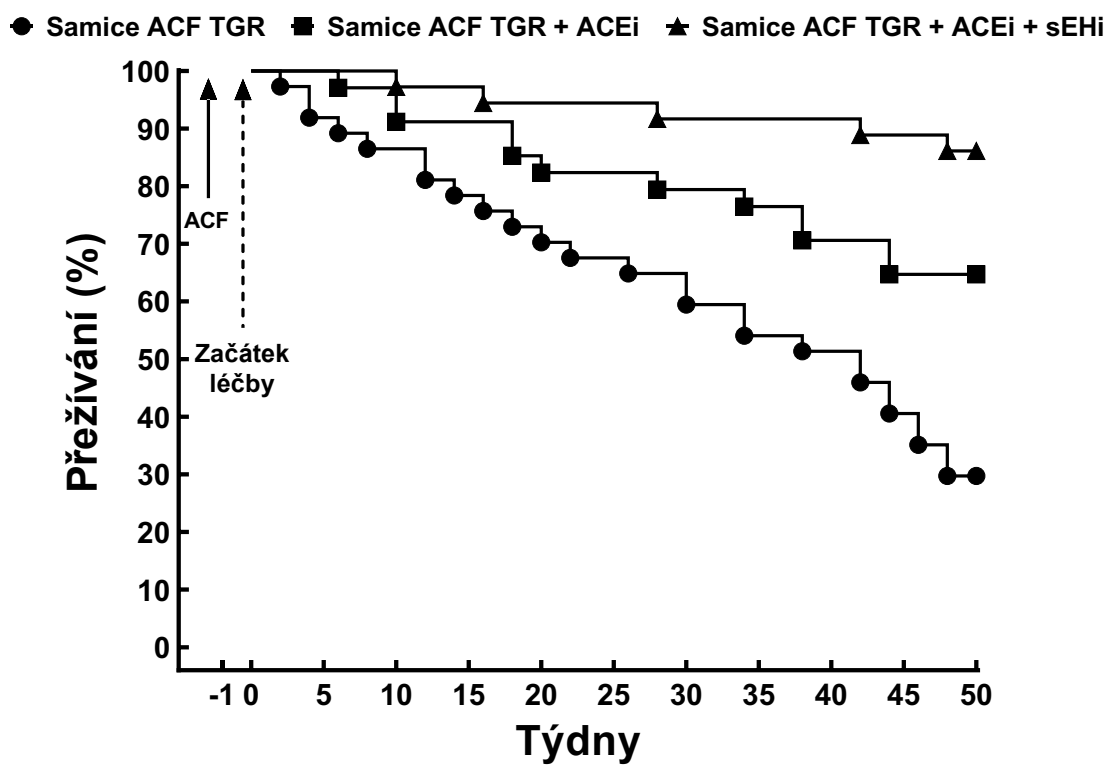
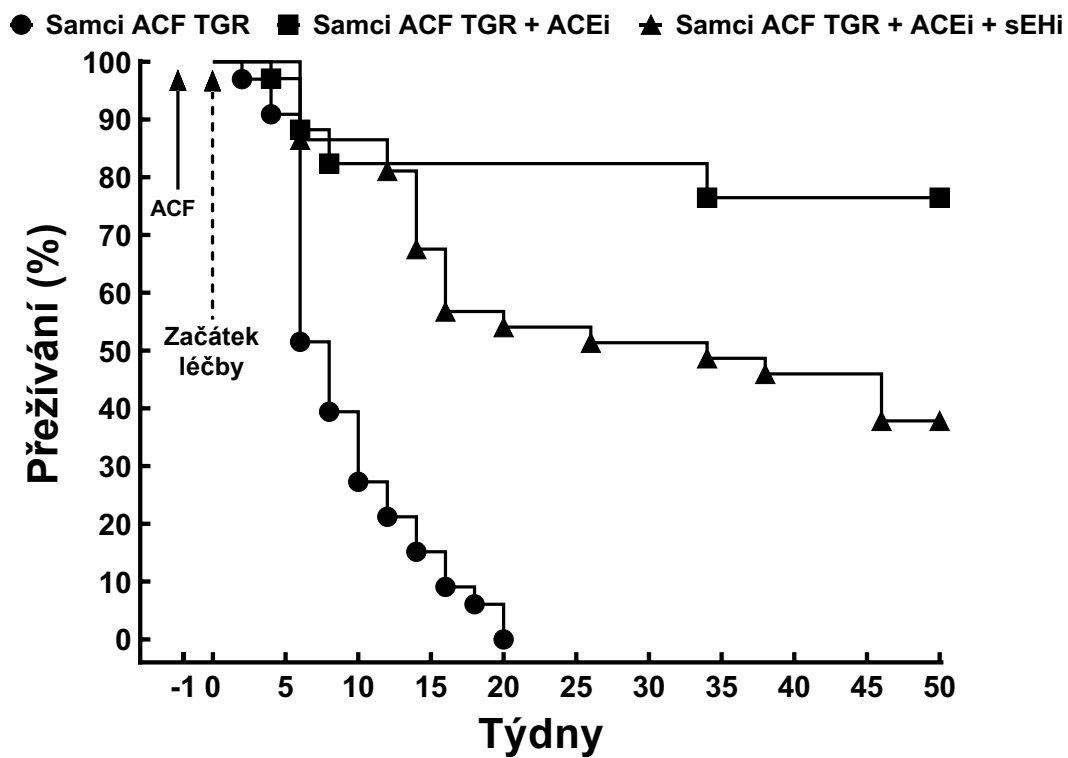
## Výsledky

Všichni HanSD samci i samice po sham proceduře přežili do konce experimentu. Neléčení ACF HanSD samci a samice začali výrazně umírat kolem týdne 15 (16 týdnů po ACF), průběh a konečné procento přežití bylo u obou pohlaví srovnatelné. U samců přežilo 7 z 26 zvířat (27 %), u samic 8 z 27 (30 %,  $p > 0,05$ ). Monoterapie ACEi zlepšila průběh u ACF HanSD, samci i samice začali umírat až po 35 týdnech a finální procento přežití bylo u samců i samic podobné. U kombinované léčby ACEi a sEH byly výsledky obdobné jako u monoterapie ACEi, u samců i samic (graf 15).

Všichni kontrolní TGR samci i samice přežili do konce experimentu. Neléčení samci ACF TGR začali umírat v týdnu 2 (3 týdny po ACF) a všichni zemřeli do týdne 20. Neléčené samice ACF TGR začali umírat v týdnu 4 (5 týdnů po ACF) a celkové přežití bylo 32 %. Monoterapie ACEi zlepšila přežívání u samců i samic s podobným celkovým procentem přežití 74 % (samci) a 65 % (samice), ( $p > 0,05$ ). Kombinovaná léčba ACEi a sEHi také zlepšila přežívání u samců ACF TGR oproti neléčené skupině s celkovým přežitím 38 %, což bylo významně horší než u monoterapie ACEi ( $p < 0,05$ ). Naopak kombinovaná léčba ACEi a sEHi zlepšila průběh u samic ACF TGR a s konečným procentem přežití 84 % byl naznačen i trend ke zlepšení oproti ACEi monoterapii ( $p > 0,05$ ) (graf 16).



Graf 15. Přežívací grafy samců a samic ACF HanSD



Graf 16. Přežívací grafy samců a samic ACF TGR



### 6.2.2. Diskuze

Nezjistili jsme významný rozdíl v přežívání po vytvoření ACF mezi neléčenými samci a samicemi HanSD potkanů, což je v souladu s naším nedávným zjištěním, že normotenzní HanSD potkani nevykazují žádné významné pohlavní rozdíly u modelu CHSS indukovaného ACF (Červenka *et al.* 2016). Zároveň námi sledované terapeutické režimy, jak v monoterapii ACEi, tak v kombinaci se sEHi, měly podobný vliv na HanSD samce i samice po ACF. Dále jsme prokázali postupné snížení účinnosti monoterapie ACEi u pokročilého CHSS při dlouhodobém sledování u samců i samic po ACF, kdy po 35. týdnu začali obě pohlaví významně umírat. To podporuje nutnost kombinovaných terapeutických přístupů s cílením na více patofyziologických mechanismů progresu CHSS, včetně hledání nových farmakologických možností (Braunwald 2015; Kassi *et al.* 2018; McDonagh *et al.* 2021). Navíc zjištění, že přidání sEHi do kombinace s ACEi dále nezlepšilo přežívání u ACF HanSD oproti monoterapii ACEi, je v souladu s naší nedávnou prací, kde monoterapie sEHi nezlepšila významně přežívání u samců ACF HanSD navzdory zvýšení myokardiální a renální tkáňové dostupnosti EETs na úroveň zjištěnou u kontrolních potkanů (Červenka *et al.* 2015a). HanSD potkani tedy nevykazují významné pohlavní rozdíly v průběhu CHSS navozeném ACF a ani v odpovědi na terapeutické režimy s ACEi a sEHi.

U hypertenzních TGR potkanů byly výsledky rozdílné. Zjistili jsme, že TGR samci mají po vytvoření ACF statisticky signifikantně vyšší mortalitu než TGR samice. Monoterapie ACEi měla srovnatelný protektivní vliv na průběh ACF navozeného CHSS u samců i samic, avšak kombinovaná léčba ACEi a sEHi měla u samců a samic TGR opačný efekt: zvýšila mortalitu u ACF TGR samců, ale snížila ji u ACF TGR samic, oproti monoterapii ACEi. Hypertenzní TGR potkani tedy vykazují výrazné pohlavní rozdíly v průběhu CHSS navozeného ACF i v efektu farmakoterapie sEHi. Při budoucích studiích zkoumajících patofyziologické aspekty CHSS u hypertenzních potkanů s aktivovaným RAAS (TGR) a potenciálně nové terapeutické možnosti by se experimenty měly provádět na obou pohlavích.

Nemáme přesné vysvětlení rozdílného efektu kombinované terapie ACEi se sEHi u TGR samců a samic s ACF, pouze několik hypotetických aspektů. Naše předchozí práce zaměřená na pohlavní rozdíly u ACF TGR po gonadektomii, dle standardních protokolů (Ostadal *et al.* 2009; Regitz-Zagrosek & Kararigas 2017), naznačila spíše škodlivý vliv testosteronu než protektivní efekt estrogenů na přežívání (Červenka *et al.* 2016). To podporuje i zjištění, že testosteron hraje důležitou roli v hypertenzí-indukovaném

poškození orgánů u samčích TGR (Vaněčková *et al.* 2011). K ověření této hypotézy ve vztahu k námi zvolené kombinované terapii u ACF TGR by bylo potřeba provést experimenty se zvířaty po gonadektomii na substituci estrogenovými a testosteronovými hormony a s postmenopauzálními samicemi s a bez hormonální substituce.

Dalším faktorem může být skutečnost, že ANG II zvyšuje tkáňovou expresi sEH (Ai *et al.* 2007). Tudíž bychom mohli spekulovat, že pohlavní rozdíly v aktivitě RAAS, tím pádem v expresi sEH, a tedy v dostupnosti aktivních EETs, se mohou spolupodílet na pohlavních rozdílech kombinované léčby ACEi a sEH. Avšak v našich předchozích pracích jsme nepozorovali významné rozdíly v plazmatických a renálních hladinách ANG II mezi samci a samicemi TGR (Husková *et al.* 2007; Vaněčková *et al.* 2011). Navíc, z našich biochemických a expresních analýz jsme nezjistili žádné pohlavní rozdíly v tkáňové srdeční a renální dostupnosti EETs, ani v proteinové expresi CYP2C23 a CYP2J3, klíčových enzymů v metabolismu EETs u ACF TGR i ACF HanSD, exprese sEH byla u ACF TGR i ACF HanSD zvýšená u obou pohlaví oproti kontrolám bez ACF (Červenka *et al.* 2015b, 2015a, 2016). To naznačuje, že pohlavní rozdíly v efektu terapeutických režimů se sEH nejsou dány pohlavním dimorfismem v produkci či degradaci EETs.

Jelikož samice TGR vyvíjí mírnější hypertenzi než samci, mohl by dalším důležitým aspektem být krevní tlak (Lee *et al.* 1996; Vaněčková *et al.* 2011). Je všeobecně uznáváno, že vztah mezi systolickým krevním tlakem a klinickým průběhem CHSS (celková a kardiovaskulární mortalita) má tvar J-křivky (Pinho-Gomes & Rahimi 2019). Dalo by se tedy uvažovat o tom, že pokles krevního tlaku po vytvoření ACF u TGR a při kombinované léčbě ACEi a sEH, bude mít již negativní celkové dopady a posune bod na J-křivce doleva ke vzrůstající mortalitě. Avšak data z naší práce s telemetrickou monitorací krevního tlaku u TGR s ACF ukazují, že po iniciálním snížení krevního tlaku dochází během 56 hodin k opětovnému zvýšení na úroveň sham operovaných normotenzních HanSD (Červenka *et al.* 2015b), navíc v předchozí studii této disertační práce jsme zjistili, že se krevní tlak u ACF TGR po dobu 2 týdnů na kombinované léčbě ACEi a sEH významně nelišil od monoterapie ACEi, tudíž nepředpokládáme výrazný aditivní antihypertenzní vliv sEH v této kombinaci. Proto se hodnoty krevního tlaku nezdají být klíčovým hybatelem pohlavních rozdílů v naší nynější studii.

Limitací této práce je, že jsme detailněji nezkoumali pohlavní rozdíly na srdeční funkci měřené echokardiograficky či invazivní P-V analýzou LK.

## 7. Závěr

V rámci naší hypotézy se podařilo prokázat snížení tkáňové dostupnosti EETs v myokardu LK a ledvině u animálního modelu CHSS ACF TGR. To bylo dáno zejména jejich zvýšenou degradací pomocí sEH na neaktivní metabolity.

Zároveň jsme ověřili, že farmakologické přístupy zvyšující dostupnost EETs vedou ke zlepšení průběhu a přežívání tohoto modelu CHSS. V kombinaci s ACEi byl u EET-A pozorován nesignifikantní trend ke zlepšení přežívání daný především zlepšením srdečních parametrů a snížením plicní kongesce. Neprokázáli jsme však významný protektivní vliv této kombinované léčby na renální funkce u ACF TGR. Kombinovaná léčba pomocí sEH s ACEi zlepšila přežívání ACF TGR oproti placebu, ale nevedla k zmírnění mortality, či renální dysfunkce oproti monoterapii ACEi, u samců (nikoliv u samic) vedla dokonce k signifikantnímu zhoršení přežívání.

Autor práce se podílel ve spolupráci s kolegy Centra experimentální medicíny Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) na provádění metod všech dílčích projektů této práce, zejména samostatně prováděl všechna echokardiografická a invazivní hemodynamická vyšetření srdce. Statisticky zpracovával získané výsledky a interpretoval je spolu se svým školitelem a konzultantem.

Přínosnost této práce je zejména v průkazu snížené tkáňové dostupnosti EETs u tohoto modelu CHSS a komplexním zhodnocení vlivu různých farmakologických přístupů k jejímu zvýšení na přežívání, srdeční a ledvinné funkce, kde byl prokázán příznivý mortalitní efekt zejména zlepšením srdečních parametrů a snížením plicní kongesce. Tato animální data podporují další výzkum, včetně klinického, v oblasti eikosanoidů a CHSS, který by v budoucnu mohl pomoci v diagnostice a terapii.

## 8. Souhrn

Na našich datech jsme prokázali snížení tkáňové dostupnosti EETs v myokardu LK i v ledvině již v časných fázích srdečního selhání navozeného objemovým přetížením pomocí ACF u TGR, což se může spolupodílet na rozvoji kardiorenálního syndromu a progresi srdečního selhání do fatálního konce. Proto jsme se zaměřili na farmakologické možnosti zvýšení tkáňové dostupnosti EETs:

1) Monoterapie EET-A oddálila manifestaci srdečního selhání a zlepšila přežívání ACF TGR. U kombinace EET-A s ACEi jsme zejména ke konci experimentu pozorovali nesignifikantní zlepšující se trend oproti monoterapii ACEi. I přes rozvoj renální dysfunkce u modelu ACF TGR nebyly prokázány renoprotektivní účinky terapií EET-A či ACEi. Příznivý vliv na přežívání byl zprostředkován zlepšením srdečních parametrů, především snížením bilaterální srdeční hypertrofie a nižší plicní kongescí, což bylo zvláště výrazné u kombinované léčby EET-A s ACEi.

2) Přidání sEHi do kombinace k ACEi nevedlo k zmírnění progresu CHSS, či zlepšení přežívání u ACF TGR, u samců vedla dokonce k signifikantnímu zhoršení. Navíc nebylo pozorováno ani zlepšení renálních funkcí. Proto se zvyšování dostupnosti EETs pomocí blokády sEH v kombinaci s ACEi nejvíce jako vhodná léčebná strategie u CHSS.

3) Dále jsme zjistili, že u animálního modelu CHSS indukovaného ACF vykazuje monoterapie ACEi podobné příznivé účinky u TGR samců i samic. Naopak kombinovaná léčba ACEi se sEHi měla rozdílný efekt: zvýšila mortalitu samců ACF TGR (oproti monoterapii ACEi) a snížila ji u samic. To naznačuje, že u CHSS a hypertenze se zvýšenou aktivitou RAAS, má pohlaví významný vliv na průběh a přežívání CHSS. Proto by měly být pohlavní rozdíly v preklinických studiích hodnoceny.

Naše výsledky souhrnně podporují další budoucí výzkum a možné využití farmakologického ovlivnění CYP-dependentní epoxygenázové dráhy metabolismu AA, zejména analogů EETs, v terapii srdečního selhání.

## 9. Summary

Our data show that the ACF TGR in the early phase of CHF exhibits substantial tissue deficiency of EETs in the left ventricle and kidney. That might significantly contribute to developing cardiorenal syndrome and progression of HF to the fatal end. Therefore we investigated the pharmacological options to increase the bioavailability of the EETs:

1) EET-A treatment delays the onset of decompensation of HF and improves the survival rate in ACF TGR. In combination therapy by EET-A and ACEi, the survival of ACF TGR only tended to improve compared with ACEi monotherapy. Although ACF TGR develops severe renal dysfunction, we did not prove the renoprotective effects of either EET-A or ACEi. Beneficial actions on survival were mediated by improving cardiac parameters, i.e., reducing bilateral cardiac hypertrophy and lung congestion. That was particularly pronounced after the combined treatment with EET-A and ACEi.

2) The addition of sEHi to ACEi treatment did not provide better protection against CHF progression or increase the survival rate in ACF TGR; indeed, the rate decreased significantly among males. We did not prove any improvement of renal functions either. Thus, increasing tissue EETs via sEH inhibition in combination with ACEi does not seem to be a promising approach to attenuate renal dysfunction and further progression of CHF.

3) We further found that the treatment with ACEi alone displayed similar beneficial effects on the course of ACF-induced HF in male and female TGR. In contrast, the combined therapy with ACEi and sEHi showed sex-dependent effects: it increased mortality (relative to ACEi treatment alone) in males and reduced it in female rats. Thus, our study strongly suggests that in HF individuals in whom hypertension and increased RAS activity run in parallel, the patients' sex is a co-determinant of the rate of progression of HF. Therefore, in pre-clinical studies, sex-linked differences should be seriously considered.

Our data strongly support the notion that targeting the CYP-dependent epoxygenase pathway of AA, especially EET analogs, should be considered in developing new pharmacological strategies for HF treatment.

## 10. Literatura

1. Abassi, Z., Goltsman, I., Karram, T., Winaver, J., & Hoffman, A. (2011). Aortocaval fistula in rat: A unique model of volume-overload congestive heart failure and cardiac hypertrophy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Hindawi Publishing Corporation, p. 13.
2. Afsar, B., Ortiz, A., Covic, A., Solak, Y., Goldsmith, D., & Kanbay, M. (2016). Focus on renal congestion in heart failure. *Clinical Kidney Journal*, **9**(1), 39–47.
3. Ai, D., Fu, Y., Guo, D., ... Zhu, Y. (2007). Angiotensin II up-regulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(21), 9018–9023.
4. Allen, L. A., Goldstein, E., Matlock, D. D., ... Spertus, J. A. (2012). Decision Making in Advanced Heart Failure A Scientific Statement From the American Heart Association: Endorsed by Heart Failure Society of America and American Association of Heart Failure MPH, FAHA on behalf of the American Heart Association Council on Quality of Care and Outcomes Research, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia Why Shared Decision Making? doi:10.1161/CIR
5. Alonso-Galicia, M., Maier, K. G., Greene, A. S., Cowley, A. W., & Roman, R. J. (2002). Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the renal and vasoconstrictor actions of angiotensin II. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **283**(1 52-1). doi:10.1152/ajpregu.00664.2001
6. Alsaad, A. M. S., Zordoky, B. N. M., Tse, M. M. Y., & El-Kadi, A. O. S. (2013). Role of cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolites in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Drug Metabolism Reviews*, **45**(2), 173–195.
7. Amorim, D. S., Heer, K., Jenner, D., ... Goodwin, J. F. (1981). Is there autonomic impairment in congestive (dilated) cardiomyopathy? *The Lancet*, **317**(8219), 525–527.
8. Anker, S. D., Colet, J. C., Filippatos, G., ... Ponikowski, P. (2009). Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *New England Journal of Medicine*, **361**(25), 2436–2448.
9. Arnold, A. P., Cassis, L. A., Eghbali, M., Reue, K., & Sandberg, K. (2017). Sex Hormones and Sex Chromosomes Cause Sex Differences in the Development of Cardiovascular Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **37**(5), 746–756.
10. Blenck, C. L., Harvey, P. A., Reckelhoff, J. F., & Leinwand, L. A. (2016). The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circulation Research*, **118**(8), 1294–1312.
11. Bolijn, R., Onland-Moret, N. C., Asselbergs, F. W., & van der Schouw, Y. T. (2017). Reproductive factors in relation to heart failure in women: A systematic review. *Maturitas*,

**106**, 57–72.

12. Booth, L. C., May, C. N., & Yao, S. T. (2015). The role of the renal afferent and efferent nerve fibers in heart failure. *Frontiers in Physiology*, **6**(OCT), 1–8.
13. Boron; Boulpaep. (2016). *Medical Physiology*, Elsevier.
14. Braam, B., Joles, J. A., Danishwar, A. H., & Gaillard, C. A. (2014). Cardiorenal syndrome--current understanding and future perspectives. *Nature Reviews. Nephrology*, **10**(1), 48–55.
15. Braunwald, E. (2015). The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet (London, England)*, **385**(9970), 812–824.
16. Briet, M., & Schiffrin, E. L. (2010). Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nature Reviews Nephrology*, **6**, 261.
17. Bristow, M. R., Scott Sageman, W., Scott, R. H., ... Daniels, J. R. (1980). Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: The cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **2**(5), 487–515.
18. Burnstock, G., & Loesch, A. (2017). Sympathetic innervation of the kidney in health and disease: Emphasis on the role of purinergic cotransmission. *Autonomic Neuroscience*, **204**, 4–16.
19. Capdevila, J., & Wang, W. (2013). Role of cytochrome P450 epoxygenase in regulating renal membrane transport and hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **22**(2), 163–169.
20. Carlson, W. D. (2012). Animal models of heart failure. *Heart Failure, Second Edition*, 78–94.
21. Carlström, M., Wilcox, C. S., & Arendshorst, W. J. (2015). Renal autoregulation in health and disease. *Physiological Reviews*, **95**(2), 405–511.
22. Červenka, L., Melenovský, V., Husková, Z., ... Sadowski, J. (2015a). Inhibition of soluble epoxide hydrolase does not improve the course of congestive heart failure and the development of renal dysfunction in rats with volume overload induced by aorto-caval fistula. *Physiological Research*, **64**(6), 857–873.
23. Červenka, L., Melenovský, V., Husková, Z., Škaroupková, P., Nishiyama, A., & Sadowski, J. (2015b). Inhibition of soluble epoxide hydrolase counteracts the development of renal dysfunction and progression of congestive heart failure in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **42**(7), 795–807.
24. Červenka, L., Škaroupková, P., Kompanowska-Jeziarska, E., & Sadowski, J. (2016). Sex-linked differences in the course of chronic kidney disease and congestive heart failure: a study in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats with volume overload induced using aorto-caval fistula. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **43**(10), 883–895.

25. Chaudhary, K. R., Zordoky, B. N. M., Edin, M. L., ... Seubert, J. M. (2013). Differential effects of soluble epoxide hydrolase inhibition and CYP2J2 overexpression on postischemic cardiac function in aged mice. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, **104–105**, 8–17.
26. Chaudhry, S. P., & Stewart, G. C. (2016). Advanced Heart Failure: Prevalence, Natural History, and Prognosis. *Heart Failure Clinics*, **12**(3), 323–333.
27. Chen, H. H. (2007). Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, **49**(10), 1089 LP – 1091.
28. Cheng, J., Garcia, V., Ding, Y., ... Schwartzman, M. L. (2012). Induction of angiotensin-converting enzyme and activation of the renin-angiotensin system contribute to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **32**(8), 1917–1924.
29. Conrad, N., Judge, A., Tran, J., ... Rahimi, K. (2018). Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *The Lancet*, **391**(10120), 572–580.
30. Cook, J. L., Grady, K. L., Colvin, M., Joseph, S. M., Brisco, M. A., & Walsh, M. N. (2015). Sex differences in the care of patients with advanced heart failure. *Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes*, **8**(2 Suppl 1), S56–S59.
31. Cops, J., Haesen, S., De Moor, B., Mullens, W., & Hansen, D. (2019, May 15). Current animal models for the study of congestion in heart failure: an overview. *Heart Failure Reviews*, Springer New York LLC, pp. 387–397.
32. Costanzo, M. R. (2020). The Cardiorenal Syndrome in Heart Failure. *Heart Failure Clinics*, **16**(1), 81–97.
33. Damman, K., Navis, G., Smilde, T. D. J., ... Hillege, H. L. (2007). Decreased cardiac output, venous congestion and the association with renal impairment in patients with cardiac dysfunction. *European Journal of Heart Failure*, **9**(9), 872–878.
34. Damman, K., & Testani, J. M. (2015). The kidney in heart failure: an update. *European Heart Journal*, **36**(23), 1437–1444.
35. De Boer, R. A., Pokharel, S., Flesch, M., ... Pinto, Y. M. (2004). Extracellular signal regulated kinase and SMAD signaling both mediate the angiotensin II driven progression towards overt heart failure in homozygous TGR(mRen2)27. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **82**(10), 678–687.
36. Dent, M. R., Tappia, P. S., & Dhalla, N. S. (2010). Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload. *Journal of Cardiac Failure*, **16**(5), 439–449.
37. Díaz, H. S., Toledo, C., Andrade, D. C., Marcus, N. J., & Del Rio, R. (2020). Neuroinflammation in heart failure: new insights for an old disease. *The Journal of Physiology*, **598**(1), 33–59.
38. Domenig, O., Manzel, A., Grobe, N., ... Poglitsch, M. (2016). Neprilysin is a Mediator of



- Alternative Renin-Angiotensin-System Activation in the Murine and Human Kidney. *Scientific Reports*, **6**, 33678.
39. Dube, P., & Weber, K. T. (2011). Congestive heart failure: pathophysiologic consequences of neurohormonal activation and the potential for recovery: part I. *The American Journal of the Medical Sciences*, **342**(5), 348–351.
  40. Dunlay, S. M., Roger, V. L., & Redfield, M. M. (2017, October 1). Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology*, Nature Publishing Group, pp. 591–602.
  41. Eisenberg, E., Di Palo, K. E., & Piña, I. L. (2018). Sex differences in heart failure. *Clinical Cardiology*, **41**(2), 211–216.
  42. Elmarakby, A. A. (2012). Reno-protective mechanisms of epoxyeicosatrienoic acids in cardiovascular disease. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **302**(3). doi:10.1152/AJPREGU.00606.2011
  43. Falck, J. R., Kodela, R., Manne, R., ... Campbell, W. B. (2009). 14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic acid (14,15-EET) surrogates containing epoxide bioisosteres: influence upon vascular relaxation and soluble epoxide hydrolase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**(16), 5069–5075.
  44. Fan, F., Muroya, Y., & Roman, R. J. (2015). Cytochrome P450 eicosanoids in hypertension and renal disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **24**(1), 37–46.
  45. Fan, F., & Roman, R. J. (2017). Effect of Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in Nephrology. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, **28**(10), 2845–2855.
  46. Flaim, S. F., Minter, W. J., Nellis, S. H., & Clark, D. P. (1979). Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **5**(5).
  47. Fleming, I. (2014). The Pharmacology of the Cytochrome P450 Epoxygenase/Soluble Epoxide Hydrolase Axis in the Vasculature and Cardiovascular Disease. *Pharmacological Reviews*. doi:10.1124/pr.113.007781
  48. Fleming, I., & Busse, R. (2006). Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension*, **47**(4), 629–633.
  49. Floras, J. S. (2009, July 28). Sympathetic Nervous System Activation in Human Heart Failure. Clinical Implications of an Updated Model. *Journal of the American College of Cardiology*, pp. 375–385.
  50. Floras, J. S., & Ponikowski, P. (2015). The sympathetic/parasympathetic imbalance in heart failure with reduced ejection fraction. *European Heart Journal*, **36**(30), 1974–1982.
  51. Florea, V. G., & Cohn, J. N. (2014, May). The autonomic nervous system and heart failure. *Circulation Research*, American Heart Association, pp. 1815–1826.

52. Gaidarov, I., Adams, J., Frazer, J., ... Unett, D. J. (2018). Angiotensin (1–7) does not interact directly with MAS1, but can potently antagonize signaling from the AT1 receptor. *Cellular Signalling*, **50**, 9–24.
53. Garcia, R., & Diebold, S. (1990). Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovascular Research*, **24**(5), 430–432.
54. Gardner, J. D., Brewer, G. L., & Janicki, J. S. (2005). Effects of dietary phytoestrogens on cardiac remodeling secondary to chronic volume overload in female rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **99**(4), 1378–1383.
55. Gauthier, K. M., Yang, W., Gross, G. J., & Campbell, W. B. (2007). Roles of epoxyeicosatrienoic acids in vascular regulation and cardiac preconditioning. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **50**(6), 601–608.
56. Gawrys, O., Husková, Z., Baranowska, I., ... Kompanowska-Jeziarska, E. (2020). Combined treatment with epoxyeicosatrienoic acid analog and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid antagonist provides substantial hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, **38**(9), 1802–1810.
57. Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., & Hsu, C. Y. (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal of Medicine*, **351**(13), 1296–1305.
58. Gonzalez-Villalobos, R. A., Janjoulia, T., Fletcher, N. K., ... McDonough, A. A. (2013). The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, **123**(5), 2011–2023.
59. Gross, G. J., Hsu, A., Pfeiffer, A. W., & Nithipatikom, K. (2013). Roles of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in epoxyeicosatrienoic acid (EET)-induced cardioprotection against infarction in intact rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **59**, 20–29.
60. Hall, J. E. (2003). Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Molecular Biotechnology*, **24**(1), 27–39.
61. Hartupee, J., & Mann, D. L. (2016). Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology*, **14**(1), 30–38.
62. Hayward, R., & Hydock, D. S. (2007). Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: An In Vivo Characterization. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **46**(4).
63. Hillege, H. L., Nitsch, D., Pfeffer, M. A., ... Van Veldhuisen, D. J. (2006). Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure. *Circulation*, **113**(5), 671–678.
64. Hilton, J. G., Kanter, D. M., Hays, D. R., ... Wegria, R. (1955). The effect of acute arteriovenous fistula on renal functions. *The Journal of Clinical Investigation*, **34**(5), 732–736.

65. Honetschlagerová, Z., Gawrys, O., Jichová, Š., ... Červenka, L. (2021). Renal Sympathetic Denervation Attenuates Congestive Heart Failure in Angiotensin II-Dependent Hypertension: Studies with Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats with Aortocaval Fistula. *Kidney & Blood Pressure Research*, **46**(1), 95–113.
66. Honetschlägerová, Z., Sporková, A., Kopkan, L., ... Cervenka, L. (2011a). Inhibition of soluble epoxide hydrolase improves the impaired pressure-natriuresis relationship and attenuates the development of hypertension and hypertension-associated end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *Journal of Hypertension*, **29**(8), 1590–601.
67. Honetschlägerová, Z., Husková, Z., Vaňourková, Z., ... Kopkan, L. (2011b). Renal mechanisms contributing to the antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *The Journal of Physiology*, **589**(Pt 1), 207–219.
68. Hsich, E. M., & Piña, I. L. (2009). Heart failure in women: a need for prospective data. *Journal of the American College of Cardiology*, **54**(6), 491–498.
69. Huang, H., Morisseau, C., Wang, J. F., ... Wang, M. H. (2007). Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, **293**(1). doi:10.1152/AJPRENAL.00004.2007
70. Husková, Z., Kramer, H., Vaňourková, Z., ... Červenka, L. (2007). Effects of dietary salt load and salt depletion on the course of hypertension and angiotensin II levels in male and female heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Kidney & Blood Pressure Research*, **30**(1), 45–55.
71. Hye Khan, M. A., Pavlov, T. S., Christain, S. V., ... Imig, J. D. (2014). Epoxyeicosatrienoic acid analogue lowers blood pressure through vasodilation and sodium channel inhibition. *Clinical Science (London, England : 1979)*, **127**(7), 463–74.
72. Ibrahim, N. E., & Januzzi, J. L. (2017). Beyond Natriuretic Peptides for Diagnosis and Management of Heart Failure. *Clinical Chemistry*, **63**(1), 211 LP – 222.
73. Imig, J. D. (2005). Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, **289**(3). doi:10.1152/AJPRENAL.00350.2004
74. Imig, J. D. (2010). Targeting epoxides for organ damage in hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **56**(4), 329–335.
75. Imig, J. D. (2019). Epoxyeicosanoids in hypertension. *Physiological Research*, **68**(5), 695–704.
76. Imig, J. D., Cervenka, L., & Neckar, J. (2021). Epoxy lipids and soluble epoxide hydrolase in heart diseases. *Biochemical Pharmacology*, **195**, 114866.
77. Imig, J. D., Cervenka, L., & Neckar, J. (2022). Epoxy lipids and soluble epoxide hydrolase in

- heart diseases. *Biochemical Pharmacology*, **195**, 114866.
78. Imig, J. D., Elmarakby, A., Nithipatikom, K., ... Falck, J. R. (2010). Development of epoxyeicosatrienoic acid analogs with in vivo anti-hypertensive actions. *Frontiers in Physiology*, **1**. doi:10.3389/FPHYS.2010.00157
79. Jíchová, Š., Doleželová, Š., Kopkan, L., Kompanowska-Jezierska, E., Sadowski, J., & Červenka, L. (2016). Fenofibrate Attenuates Malignant Hypertension by Suppression of the Renin-angiotensin System: A Study in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats. *The American Journal of the Medical Sciences*, **352**(6), 618–630.
80. Johnson, D. W., Craven, A. M., & Isbel, N. M. (2007, January). Modification of cardiovascular risk in hemodialysis patients: An evidence-based review. *Hemodialysis International*, pp. 1–14.
81. Joly, E., Seqqat, R., Flamion, B., ... Kramp, R. (2006). Increased renal vascular reactivity to ANG II after unilateral nephrectomy in the rat involves 20-HETE. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **291**(4). doi:10.1152/ajpregu.00401.2005
82. Kaergel, E., Muller, D. N., Honeck, H., ... Schunck, W. H. (2002). P450-dependent arachidonic acid metabolism and angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*, **40**(3), 273–279.
83. Karram, T., Hoffman, A., Bishara, B., ... Abassi, Z. (2005). Induction of cardiac hypertrophy by a controlled reproducible sutureless aortocaval shunt in the mouse. *Journal of Investigative Surgery*, **18**(6), 325–334.
84. Kassi, M., Hannawi, B., & Trachtenberg, B. (2018). Recent advances in heart failure. *Current Opinion in Cardiology*, **33**(2), 249–256.
85. Kishimoto, T., Maekawa, M., Abe, Y., & Yamamoto, K. (1973). Intrarenal distribution of blood flow and renin release during renal venous pressure elevation. *Kidney International*, **4**(4), 259–266.
86. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., & Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological Reviews*, **59**(3), 251–287.
87. Komajda, M., Anker, S. D., Charlesworth, A., ... Poole-Wilson, P. A. (2006). The impact of new onset anaemia on morbidity and mortality in chronic heart failure: Results from COMET. *European Heart Journal*, **27**(12), 1440–1446.
88. Kopkan, L., Kramer, H. J., Husková, Z., ... Červenka, L. (2005). The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats. *Journal of Hypertension*, **23**(8), 1531–1539.
89. Kopp, U. C., Olson, L. A., & DiBona, G. F. (1984). Renorenal reflex responses to mechano- and chemoreceptor stimulation in the dog and rat. *American Journal of Physiology-Renal*

*Physiology*, **246**(1), F67–F77.

90. Kottgen, A., Russell, S. D., Loehr, L. R., ... Coresh, J. (2007). Reduced kidney function as a risk factor for incident heart failure: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, **18**(4), 1307–1315.
91. Kratky, V., Vanourkova, Z., Sykora, M., ... Kopkan, L. (2021). AT 1 receptor blocker, but not an ACE inhibitor, prevents kidneys from hypoperfusion during congestive heart failure in normotensive and hypertensive rats. *Scientific Reports*, **11**(1). doi:10.1038/S41598-021-83906-6
92. Lai, J., & Chen, C. (2021). The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Frontiers in Physiology*, **12**. doi:10.3389/FPHYS.2021.642470
93. Lala, A., & Desai, A. S. (2014, April). The role of coronary artery disease in heart failure. *Heart Failure Clinics*, Elsevier Inc., pp. 353–365.
94. Lam, C. S. P., Arnott, C., Beale, A. L., ... Voors, A. A. (2019). Sex differences in heart failure. *European Heart Journal*, **40**(47), 3859–3868.
95. Lam, C. S. P., McEntegart, M., Claggett, B., ... Solomon, S. (2015). Sex differences in clinical characteristics and outcomes after myocardial infarction: insights from the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT). *European Journal of Heart Failure*, **17**(3), 301–312.
96. Lee, A. F. C., MacFadyen, R. J., & Struthers, A. D. (2001). Neurohormonal reactivation in heart failure patients on chronic ACE inhibitor therapy: a longitudinal study. *European Journal of Heart Failure*, **1**(4), 401–406.
97. Lee, M. A. E., Böhm, M., Paul, M., Bader, M., Ganten, U., & Ganten, D. (1996). Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *The American Journal of Physiology*, **270**(6 Pt 1). doi:10.1152/AJPENDO.1996.270.6.E919
98. Lee, N. S., & Daniels, L. B. (2016). Current Understanding of the Compensatory Actions of Cardiac Natriuretic Peptides in Cardiac Failure: A Clinical Perspective. *Cardiac Failure Review*, **2**(1), 14–19.
99. Lefebvre, P., Vekeman, F., Sarokhan, B., Enny, C., Provenzano, R., & Cremieux, P. Y. (2006). Relationship between hemoglobin level and quality of life in anemic patients with chronic kidney disease receiving epoetin alfa. *Current Medical Research and Opinion*, **22**(10), 1929–1937.
100. Lemarié, C. A., & Schiffrin, E. L. (2009). The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, **11**(1), 19–31.
101. Lewis, E. F., Lamas, G. A., O' Meara, E., ... Pfeffer, M. A. (2007). Characterization of health-related quality of life in heart failure patients with preserved versus low ejection fraction in CHARM. *European Journal of Heart Failure*, **9**(1), 83–91.
102. Lewis, G. D., Malhotra, R., Hernandez, A. F., ... Braunwald, E. (2017). Effect of oral iron

- repletion on exercise capacity in patients with heart failure with reduced ejection fraction and iron deficiency the IRONOUT HF randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, **317**(19), 1958–1966.
103. Li, X., Zhu, F., Meng, W., ... Wang, F. (2020). CYP2J2/EET reduces vulnerability to atrial fibrillation in chronic pressure overload mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **24**(1), 862–874.
  104. Li, Y., Li, X.-H., & Yuan, H. (2012). Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, **2**(1), 56–62.
  105. Ljungman, S., Laragh, J. H., & Cody, R. J. (1990). Role of the Kidney in Congestive Heart Failure. *Drugs*, **39**(4), 10–21.
  106. Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Leip, E. P., ... Levy, D. (2002). Lifetime risk for developing congestive heart failure: The Framingham Heart Study. *Circulation*, **106**(24), 3068–3072.
  107. Locatelli, F., Pisoni, R. L., Combe, C., ... Held, P. J. (2004). Anaemia in haemodialysis patients of five European countries: Association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrology Dialysis Transplantation*, **19**(1), 121–132.
  108. Lopez, A., Cacoub, P., Macdougall, I. C., & Peyrin-Biroulet, L. (2016). Iron deficiency anaemia. *The Lancet*, **387**(10021), 907–916.
  109. Lu, H., Meléndez, G. C., Levick, S. P., & Janicki, J. S. (2012). Prevention of adverse cardiac remodeling to volume overload in female rats is the result of an estrogen-altered mast cell phenotype. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **302**(3). doi:10.1152/AJPHEART.00980.2011
  110. Luff, S. E., Hengstberger, S. G., McLachlan, E. M., & Anderson, W. P. (1992). Distribution of sympathetic neuroeffector junctions in the juxtaglomerular region of the rabbit kidney. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **40**(3), 239–253.
  111. Ma, T. K. W., Kam, K. K. H., Yan, B. P., & Lam, Y.-Y. (2010). Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British Journal of Pharmacology*, **160**(6), 1273–1292.
  112. Matavelli, L. C., & Siragy, H. M. (2015). AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **65**(3), 226–232.
  113. McAlister, F. A., Ezekowitz, J., Tonelli, M., & Armstrong, P. W. (2004). Renal Insufficiency and Heart Failure: Prognostic and Therapeutic Implications from a Prospective Cohort Study. *Circulation*, **109**(8), 1004–1009.
  114. McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., ... Heymans, S. (2021, September 21). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, Eur Heart J, pp. 3599–3726.

115. McGuire, W. P., Penson, R. T., Gore, M., ... Ilaria, R. (2018). Randomized phase II study of the PDGFR $\alpha$  antibody olaratumab plus liposomal doxorubicin versus liposomal doxorubicin alone in patients with platinum-refractory or platinum-resistant advanced ovarian cancer. *BMC Cancer*, **18**(1), 1292.
116. Melenovsky, V., Andersen, M. J., Andress, K., Reddy, Y. N., & Borlaug, B. A. (2015). Lung congestion in chronic heart failure: Haemodynamic, clinical, and prognostic implications. *European Journal of Heart Failure*, **17**(11), 1161–1171.
117. Melenovsky, V., Benes, J., Skaroupkova, P., ... Cervenka, L. (2011). Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **354**(1–2), 83–96.
118. Melenovsky, V., Petrak, J., Mracek, T., ... Houstek, J. (2017). Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *European Journal of Heart Failure*, **19**(4), 522–530.
119. Melenovsky, V., Skaroupkova, P., Benes, J., Torresova, V., Kopkan, L., & Cervenka, L. (2012). The course of heart failure development and mortality in rats with volume overload due to aorto-caval fistula. *Kidney and Blood Pressure Research*, **35**(3), 167–173.
120. Mentz, R. J., Greene, S. J., Ambrosy, A. P., ... Gheorghiade, M. (2014). Clinical profile and prognostic value of anemia at the time of admission and discharge among patients hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction findings from the EVEREST trial. *Circulation: Heart Failure*, **7**(3), 401–408.
121. Metra, M., & Teerlink, J. R. (2017, October 28). Heart failure. *The Lancet*, Lancet Publishing Group, pp. 1981–1995.
122. Miller, L. R., Marks, C., Becker, J. B., ... Clayton, J. A. (2017). Considering sex as a biological variable in preclinical research. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **31**(1), 29–34.
123. Mullins, J. J., Peters, J., & Ganten, D. (1990). Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*, **344**(6266), 541–544.
124. Myers, B., M Deen, W., & M Brenner, B. (1975). Effects of norepinephrine and angiotensin II on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat. *Circulation Research*, **37**, 101–110.
125. Nayeem, M. A., Zeldin, D. C., Boegehold, M. A., ... Falck, J. R. (2010). Modulation by salt intake of the vascular response mediated through adenosine A2A receptor: Role of CYP epoxygenase and soluble epoxide hydrolase. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **299**(1). doi:10.1152/ajpregu.00823.2009
126. Neckář, J., Hsu, A., Hye Khan, M. A., ... Imig, J. D. (2018). Novel mechanisms of myocardial ischemia, ischemia-reperfusion, and protection by myocardial conditioning: Infarct size-limiting effect of epoxyeicosatrienoic acid analog EET-B is mediated by

- hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  via downregulation of prolyl hydroxylase 3. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **315**(5), H1148–H1158.
127. Nicklin, S. A. (2016, December 1). A Novel Mechanism of Action for Angiotensin-(1-7) via the Angiotensin Type 1 Receptor. *Hypertension*, Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1342–1343.
128. Nithipatikom, K., Moore, J. M., Isbell, M. A., Falck, J. R., & Gross, G. J. (2006). Epoxyeicosatrienoic acids in cardioprotection: Ischemic versus reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **291**(2). doi:10.1152/ajpheart.00071.2006
129. Obokata et al. (2018). Haemodynamics, dyspnoea, and pulmonary reserve in heart failure with preserved ejection fraction. *European Heart Journal*, pp. 2822–2824.
130. Okonko, D. O., Grzeslo, A., Witkowski, T., ... Ponikowski, P. (2008). Effect of Intravenous Iron Sucrose on Exercise Tolerance in Anemic and Nonanemic Patients With Symptomatic Chronic Heart Failure and Iron Deficiency. FERRIC-HF: A Randomized, Controlled, Observer-Blinded Trial. *Journal of the American College of Cardiology*, **51**(2), 103–112.
131. Oliver-Dussault, C., Ascah, A., Marcil, M., ... Deschepper, C. F. (2010). Early predictors of cardiac decompensation in experimental volume overload. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **338**(1–2), 271–282.
132. Opočenský, M., Dvořák, P., Kramer, H. J., ... Červenka, L. (2004). Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney and Blood Pressure Research*, **27**(4), 248–258.
133. Ostadal, B., Netuka, I., Maly, J., Besik, J., & Ostadalova, I. (2009). Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, **234**(9), 1011–1019.
134. Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Bátkai, S., & Kass, D. A. (2008). Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature Protocols*, **3**(9), 1422–1434.
135. Packer, M. (1992). The neurohormonal hypothesis: A theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, **20**(1), 248–254.
136. Packer, M., & McMurray, J. J. V. (2017). Importance of endogenous compensatory vasoactive peptides in broadening the effects of inhibitors of the renin-angiotensin system for the treatment of heart failure. *Lancet (London, England)*, **389**(10081), 1831–1840.
137. Paxton, W. G., Runge, M., Horaist, C., Cohen, C., Alexander, R. W., & Bernstein, K. E. (1993). Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **264**(6), F989–F995.
138. Persson, P. B. (2003). Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of Physiology*,



552(Pt 3), 667–671.

139. Petrak, J., Havlenova, T., Krijt, M., ... Melenovsky, V. (2019). Myocardial iron homeostasis and hepcidin expression in a rat model of heart failure at different levels of dietary iron intake. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1863**(4), 703–713.
140. Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A., & Braunwald, E. (1985a). Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circulation Research*, **57**(1), 84–95.
141. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Fishbein, M. C., ... Braunwald, E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*, **44**(4), 503–512.
142. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Steinberg, C., & Finn, P. (1985b). Survival after an experimental myocardial infarction: Beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*, **72**(2), 406–412.
143. Pfeffer, M. A., Shah, A. M., & Borlaug, B. A. (2019, May 24). Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Perspective. *Circulation Research*, Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1598–1617.
144. Pinho-Gomes, A. C., & Rahimi, K. (2019). Management of blood pressure in heart failure. *Heart (British Cardiac Society)*, **105**(8), 589–595.
145. Pokorný, M., Mrázová, I., Kubátová, H., ... Netuka, I. (2019). Intraventricular placement of a spring expander does not attenuate cardiac atrophy of the healthy heart induced by unloading via heterotopic heart transplantation. *Physiological Research*, **68**(4), 567–580.
146. Ponikowski, P., Kirwan, B. A., Anker, S. D., ... Stanislavchuk, M. (2020). Ferric carboxymaltose for iron deficiency at discharge after acute heart failure: a multicentre, double-blind, randomised, controlled trial. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(20)32339-4
147. Ponikowski, P., Van Veldhuisen, D. J., Comin-Colet, J., ... Anker, S. D. (2015). Beneficial effects of long-term intravenous iron therapy with ferric carboxymaltose in patients with symptomatic heart failure and iron deficiency. *European Heart Journal*, **36**(11), 657–668.
148. Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., ... Davies, C. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, **37**(27), 2129-2200m.
149. Raina, R., Nair, N., Chakraborty, R., Nemer, L., Dasgupta, R., & Varian, K. (2020). An Update on the Pathophysiology and Treatment of Cardiorenal Syndrome. *Cardiology Research*, **11**(2), 76–88.
150. Ramchandra, R., & Barrett, C. J. (2015). Regulation of the renal sympathetic nerves in heart failure. *Frontiers in Physiology*, **6**, 238.
151. Rangaswami, J., Bhalla, V., Blair, J. E. A., ... Cardiology, O. behalf of the A. H. A. C. on the K. in C. D. and C. on C. (2019). Cardiorenal Syndrome: Classification, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Strategies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, **139**(16). doi:10.1161/CIR.0000000000000664

152. Re, R. N. (2017). A Reassessment of the Pathophysiology of Progressive Cardiorenal Disorders. *The Medical Clinics of North America*, **101**(1), 103–115.
153. Reddy, Y. N. V., Obokata, M., Verbrugge, F. H., Lin, G., & Borlaug, B. A. (2020). Atrial Dysfunction in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, **76**(9), 1051–1064.
154. Reddy, Y. N. V., Obokata, M., Wiley, B., ... Borlaug, B. A. (2019). The haemodynamic basis of lung congestion during exercise in heart failure with preserved ejection fraction. *European Heart Journal*, **40**(45), 3721–3730.
155. Regitz-Zagrosek, V., & Kararigas, G. (2017). Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Physiological Reviews*, **97**(1), 1–37.
156. Renkin, E. M. (1986). Some consequences of capillary permeability to macromolecules: Starling's hypothesis reconsidered. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **250**(5).
157. Reynolds, H. R., Bairey Merz, C. N., Berry, C., ... Wei, J. (2022). Coronary Arterial Function and Disease in Women With No Obstructive Coronary Arteries. *Circulation Research*, **130**(4), 529–551.
158. Ric R Ose, E. A., Nnetine G Elijns, A. C., Lan M Oskowitz, A. J., ... Tudy Roup, S. G. (2001). Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure for the randomized evaluation od mechanical assistance for the treatment of congestive heart failure. *N Engl J Med*, **345**(20). Retrieved from [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
159. Riegger, A. J. G., & Liebau, G. (1982). The Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Antidiuretic Hormone and Sympathetic Nerve Activity in an Experimental Model of Congestive Heart Failure in the Dog. *Clinical Science*, **62**(5), 465 LP – 469.
160. Riehle, C., & Bauersachs, J. (2019). Small animal models of heart failure. *Cardiovascular Research*, **115**(13), 1838–1849.
161. Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **10**(4), 853–858.
162. Rocic, P., & Schwartzman, M. L. (2018). 20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function. *Pharmacology & Therapeutics*, **192**, 74–87.
163. Rockman, H. A., Wachhorst, S. P., Mao, L., & Ross, J. (1994). ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **266**(6 35-6).
164. Roger, V. L. (2013). Epidemiology of heart failure. *Circulation Research*, **113**(6), 646–659.
165. Roman, R. J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological Reviews*, **82**(1), 131–185.
166. Roumelioti, M.-E., Glew, R. H., Khitan, Z. J., ... Tzamaloukas, A. H. (2018). Fluid balance concepts in medicine: Principles and practice. *World Journal of Nephrology*, **7**(1), 1–28.

167. Rundqvist, B., Lambert, G., Eisenhofer, G., Petersson, M., & Friberg, P. (2005). Long-term outcome in relation to renal sympathetic activity in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal*, **26**(9), 906–913.
168. Ruster, C., & Wolf, G. (2011). Angiotensin II as a Morphogenic Cytokine Stimulating Renal Fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, **22**(7), 1189 LP – 1199.
169. Sachse, A., & Wolf, G. (2007). Angiotensin II–Induced Reactive Oxygen Species and the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, **18**(9), 2439 LP – 2446.
170. Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., ... Campagnole-Santo, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, **98**(1), 505–553.
171. Savarese, G., & D’Amario, D. (2018). Sex differences in heart failure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1065**, 529–544.
172. Savarese, G., & Lund, L. H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*, **3**(1), 7–11.
173. Schefold, J. C., Filippatos, G., Hasenfuss, G., Anker, S. D., & Von Haehling, S. (2016). Heart failure and kidney dysfunction: Epidemiology, mechanisms and management. *Nature Reviews Nephrology*, **12**(10), 610–623.
174. Sedláková, L., Kikerlová, S., Husková, Z., ... Kopkan, L. (2018). 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid antagonist attenuates the development of malignant hypertension and reverses it once established: a study in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats. *Bioscience Reports*, **38**(5). doi:10.1042/BSR20171496
175. Shah, A. S. V., Langrish, J. P., Nair, H., ... Mills, N. L. (2013). Global association of air pollution and heart failure: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, **382**(9897), 1039–1048.
176. Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirosou, M., & Coffman, T. M. (2014). Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, **4**(3), 1201–1228.
177. Sporková, A., Husková, Z., Škaroupková, P., ... Cervenka, L. (2017). Vasodilatory responses of renal interlobular arteries to epoxyeicosatrienoic acids analog are not enhanced in Ren-2 transgenic hypertensive rats: evidence against a role of direct vascular effects of epoxyeicosatrienoic acids in progression of experimental heart failure. *Physiological Research*, **66**(1), 29–39.
178. Sporková, A., Kopkan, L., Varcabová, Š., ... Červenka, L. (2011). Role of cytochrome P-450 metabolites in the regulation of renal function and blood pressure in 2-kidney 1-clip hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **300**(6), 1468–1475.
179. Stolfo, D., Uijl, A., Vedin, O., ... Savarese, G. (2019). Sex-Based Differences in Heart

- Failure Across the Ejection Fraction Spectrum: Phenotyping, and Prognostic and Therapeutic Implications. *JACC: Heart Failure*, **7**(6), 505–515.
180. Sudhakar, V., Shaw, S., & Imig, J. (2010). Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs and Vascular Function. *Current Medicinal Chemistry*, **17**(12), 1181–1190.
181. Takahama, H., & Kitakaze, M. (2017). Pathophysiology of cardiorenal syndrome in patients with heart failure: potential therapeutic targets. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **313**(4), H715–H721.
182. Teerlink, J. R., Pfeffer, J. M., & Pfeffer, M. A. (1994). Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circulation Research*, **75**(1), 105–113.
183. Tim Goodnough, L., Comin-Colet, J., Leal-Noval, S., ... Shander, A. (2017). Management of anemia in patients with congestive heart failure. *American Journal of Hematology*, **92**(1), 88–93.
184. Vacková, Š., Kikerlová, S., Melenovsky, V., ... Červenka, L. (2019). Altered Renal Vascular Responsiveness to Vasoactive Agents in Rats with Angiotensin II-Dependent Hypertension and Congestive Heart Failure. *Kidney & Blood Pressure Research*, **44**(4), 792–809.
185. van Bilsen, M., Patel, H. C., Bauersachs, J., ... Lyon, A. R. (2017). The autonomic nervous system as a therapeutic target in heart failure: a scientific position statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure*, **19**(11), 1361–1378.
186. Van Deursen, V. M., Urso, R., Laroche, C., ... Voors, A. A. (2014). Co-morbidities in patients with heart failure: An analysis of the European heart Failure Pilot Survey. *European Journal of Heart Failure*, **16**(1), 103–111.
187. Van Dokkum, R. P. E., Sun, C. W., Provoost, A. P., Jacob, H. J., & Roman, R. J. (1999). Altered renal hemodynamics and impaired myogenic responses in the fawn-hooded rat. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **276**(3 45-3). doi:10.1152/ajpregu.1999.276.3.r855
188. Vaněčková, I., Husková, Z., Vaňourková, Z., & Červenka, L. (2011). Castration has antihypertensive and organoprotective effects in male but not in female heterozygous Ren-2 rats. *Kidney & Blood Pressure Research*, **34**(1), 46–52.
189. Volpe, M., Carnovali, M., & Mastroianni, V. (2016). The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clinical Science*, **130**(2), 57 LP – 77.
190. Walkowska, A., Červenka, L., Imig, J. D., Falck, J. R., Sadowski, J., & Kompanowska-Jeziarska, E. (2021). Early Renal Vasodilator and Hypotensive Action of Epoxyeicosatrienoic Acid Analog (EET-A) and 20-HETE Receptor Blocker (AAA) in Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in Physiology*, **12**.

doi:10.3389/FPHYS.2021.622882

191. Wang, K., Basu, R., Poglitsch, M., Bakal, J. A., & Oudit, G. Y. (2020). Elevated Angiotensin 1-7/Angiotensin II Ratio Predicts Favorable Outcomes in Patients With Heart Failure. *Circulation. Heart Failure*, **13**(7), 95–106.
192. Wang, W. H., Lu, M., & Hebert, S. C. (1996). Cytochrome P-450 metabolites mediate extracellular Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of apical K<sup>+</sup> channels in the TAL. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, **271**(1 40-1). doi:10.1152/ajpcell.1996.271.1.c103
193. Wang, W. H., Zhang, C., Lin, D. H., ... Capdevila, J. H. (2014). Cyp2c44 epoxygenase in the collecting duct is essential for the high K<sup>+</sup> intake-induced antihypertensive effect. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, **307**(4). doi:10.1152/ajprenal.00123.2014
194. Watson, A. M. D., Hood, S. G., & May, C. N. (2006). MECHANISMS OF SYMPATHETIC ACTIVATION IN HEART FAILURE. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **33**(12), 1269–1274.
195. Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, **389**(10075), 1238–1252.
196. Wei, Y., Lin, D. H., Kemp, R., ... Wang, W. H. (2004). Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. *Journal of General Physiology*, **124**(6), 719–727.
197. Wei, Y., Sun, P., Wang, Z. J., Yang, B. F., Carroll, M. A., & Wang, W. H. (2006). Adenosine inhibits ENaC via cytochrome P-450 epoxygenase-dependent metabolites of arachidonic acid. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, **290**(5). doi:10.1152/ajprenal.00301.2005
198. Weiss, G., Ganz, T., & Goodnough, L. T. (2019). Anemia of inflammation. *Blood*, **133**(1), 40–50.
199. Westerman, S., & Wenger, N. K. (2016). Women and heart disease, the underrecognized burden: sex differences, biases, and unmet clinical and research challenges. *Clinical Science (London, England : 1979)*, **130**(8), 551–563.
200. Westphal, C., Spallek, B., Konkel, A., ... Fischer, R. (2013). CYP2J2 Overexpression Protects against Arrhythmia Susceptibility in Cardiac Hypertrophy. *PLoS ONE*, **8**(8). doi:10.1371/journal.pone.0073490
201. Williams, J. M., Murphy, S., Burke, M., & Roman, R. J. (2010, October). 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: A new target for the treatment of hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology, J Cardiovasc Pharmacol*, pp. 336–344.
202. Wong, P. C. Y., Guo, J., & Zhang, A. (2017). The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. *Advances in Physiology Education*, **41**(2), 179–185.
203. Wu, S., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Falck, J. R., & Zeldin, D. C. (1996). Molecular

- cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(7), 3460–3468.
204. Zablocki, D., & Sadoshima, J. (2010). The one-two punch: knocking out angiotensin II in the heart. *The Journal of Clinical Investigation*, **120**(4), 1028–1031.
205. Zannad, F., Ferreira, J. P., Pocock, S. J., ... Packer, M. (2021). Cardiac and Kidney Benefits of Empagliflozin in Heart Failure Across the Spectrum of Kidney Function: Insights From EMPEROR-Reduced. *Circulation*, **143**(4), 310–321.
206. Zhang, C., Booz, G. W., Yu, Q., He, X., Wang, S., & Fan, F. (2018). Conflicting roles of 20-HETE in hypertension and renal end organ damage. *European Journal of Pharmacology*, **833**, 190–200.
207. Zhang, D. Y., & Anderson, A. S. (2014). The Sympathetic Nervous System and Heart Failure. *Cardiology Clinics*, **32**(1), 33–45.
208. Zhao, Q., Huang, J., Wang, D., Chen, L., Sun, D., & Zhao, C. (2018, October 1). Endothelium-specific CYP2J2 overexpression improves cardiac dysfunction by promoting angiogenesis via Jagged1/Notch1 signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Academic Press, pp. 118–127.
209. Zhuo, J., Ferrao, F., Zheng, Y., & Li, X. (2013). New Frontiers in the Intrarenal Renin-Angiotensin System: A Critical Review of Classical and New Paradigms. *Frontiers in Endocrinology*, **4**, 166.
210. Ziaeian, B., & Fonarow, G. C. (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, **13**(6), 368–378.
211. Zou, A. P., Imig, J. D., Ortiz de Montellano, P. R., Sui, Z., Falck, J. R., & Roman, R. J. (1994). Effect of P-450  $\omega$ -hydroxylase metabolites of arachidonic acid on tubuloglomerular feedback. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, **266**(6 35-6). doi:10.1152/ajprenal.1994.266.6.f934

## 10. Publikační činnost autora disertační práce

### Publikace, ze kterých vychází tato disertační práce

1) **Kala P**, Sedláková L, Škaroupková P, Kopkan L, Vaňourková Z, Táborský M, Nishiyama A, Hwang SH, Hammock BD, Sadowski J, Melenovský V, Imig JD, Červenka L. Effect of angiotensin-converting enzyme blockade, alone or combined with blockade of soluble epoxide hydrolase, on the course of congestive heart failure and occurrence of renal dysfunction in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula. *Physiol Res*. 2018;67(3):401-415. (IF 1,880)

2) **Kala P**, Červenka L, Škaroupková P, Táborský M, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J. Sex-linked differences in the mortality in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula: effects of treatment with angiotensin converting enzyme alone and combined with inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Physiol Res*. 2019;68(4):589-601. (IF 1,880)

3) **Kala P**, Miklovič M, Jíchová Š, Škaroupková P, Vaňourková Z, Maxová H, Gawrys O, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Imig JD, Falck JR, Veselka J, Červenka L, Aiglová R, Vícha M, Gloger V, Táborský M. Effects of Epoxyeicosatrienoic Acid-Enhancing Therapy on the Course of Congestive Heart Failure in Angiotensin II-Dependent Rat Hypertension: From mRNA Analysis towards Functional In Vivo Evaluation. *Biomedicines*. 2021; 9(8):1053. (IF 6,081)

### Další publikace, které volně souvisejí s tématem disertační práce

4) **Kala P**, Bartušková H, Piřha J, Vaňourková Z, Kikerlová S, Jíchová Š, Melenovský V, Hošková L, Veselka J, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Gawrys O, Maxová H, Červenka L. Deleterious Effects of Hyperactivity of the Renin-Angiotensin System and Hypertension on the Course of Chemotherapy-Induced Heart Failure after Doxorubicin Administration: A Study in Ren-2 Transgenic Rat. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9337. (IF 5,924)

5) Jíchová Š, Gawryś O, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Melenovský V, Hošková L, Červenka L, **Kala P**, Veselka J, Čertíková Chábová V. Kidney Response to Chemotherapy-Induced Heart Failure: mRNA Analysis in Normotensive and Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(16):8475. (IF 5,924)

### **Publikace, které s tématem disertační práce přímo nesouvisí**

6) **Kala P**, Tesař D, Hájek P, Adlová R, Veselka J. Combined percutaneous approach for aortic valve implantation in poor vascular access. *Bratisl Lek Listy*. 2020;121(8):537-540. (IF 1,278)

### **Řešené granty**

1) GAUK č. 32218 řešený v letech 2018 – 2021

Vliv kombinované léčby pomocí inhibitoru angiotenzin-konvertujícího enzymu a inhibitoru solubilní epoxid hydrolázy na progresi chronického srdečního selhání a rozvoj renální dysfunkce u Ren-2 transgenních potkanů s aorto-kavální píštělí.

2) GAUK č. 68121 řešený v letech 2021 – současnost

Vliv kombinované léčby selektivním antagonistou endotelinového receptoru typu A a inhibitorem angiotenzin-konvertujícího enzymu na progresi chronického srdečního selhání a rozvoj renální dysfunkce u Ren-2 transgenních potkanů s aorto-kavální píštělí.